



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI – UNIVATES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBiotec

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
UM TERPENÓ EM LINHAGEM DE CÂNCER DE PULMÃO DE
PEQUENAS CÉLULAS (A549)**

Stefani Natali Stoll

Lajeado, janeiro de 2018

Stefani Natali Stoll

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
UM TERPENÓ EM LINHAGEM DE CÂNCER DE PULMÃO DE
PEQUENAS CÉLULAS (A549)**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia em Saúde
do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade do Vale do
Taquari – Univates.

Orientadora: Dra. Márcia Inês Goettert
Co-orientador: Dra. Shanna Bitencourt

Lajeado, janeiro de 2018

À Deus, meu ídolo e protetor, cujo amor e cuidado transcende o entendimento humano! Aos meus pais, meus exemplos de perseverança, garra e humildade, meu porto-seguro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu amigo fiél, pela vida e saúde, por sempre me mostrar que mesmo quando pensamos ter perdido o controle, Ele mostra que é Deus! E que nada, jamais, foge do poder de Suas mãos!

Aos meus pais pela excelente criação, ensinamentos e amor! Por serem minha base de caráter e humildade.

Ao meu namorado Júlio, pelo companheirismo, incentivo e amor.

À minha orientadora Dr. Márcia Inês Goetttert por todos ensinamentos e oportunidades que me proporcionou durante o mestrado! Pela disposição, atenção e amizade.

À minha co-orientadora Dr. Shanna Bitencourt pelos ensinamentos, companheirismo durante os árduos experimentos e análises, pela paciência, pelos conselhos e amizade conquistada!

Aos professores Dr. Ana Abujamra, Dr. João Tassinary e Dr. Lia Possuelo, pelo aceite de participarem da minha banca avaliadora e contribuições em meu trabalho.

À CAPES pela bolsa, apoio financeiro e fomento em pesquisa.

A UNIVATES pela estrutura física e corpo docente que possibilita formar e capacitar excelentes profissionais.

Aos colegas do Laboratório Cultura de Células pelo apoio em todos momentos, auxílio em experimentos, pelos momentos de descontração e cafés no intervalo.

Às minhas amigas de fé, “deusas”, pela compreensão quando ausências em encontros e pela amizade verdadeira de mais de uma década!

Ao prof. Dr. Stefan Laufer pela oportunidade concedida de realizar o estágio no Laboratório de Química Médica e Farmacêutica na Universidade de Tübingen, Alemanha e aos técnicos Katharina Bauer e Jens Strobach.

Ao Ms. Heron Fernandes (UNIFESP) pelo auxílio em análises de citometria.

Aos meus gatos (risos), Minty, Romeu e Julieta, pelo carinho e conforto nas noites de estudo.

RESUMO

O câncer se trata de uma das principais causas de mortes no mundo, sendo o câncer de pulmão o primeiro em incidência mundial. No Brasil, o câncer de pulmão é o segundo principal responsável por mortes por câncer em homens (após câncer de próstata) e o quarto em mulheres - sendo o Rio Grande do Sul o segundo estado brasileiro com maior incidência de casos de câncer. Caracterizado pelo crescimento desordenado e desenfreado de células, o desenvolvimento tumoral é definido pela evasão da morte celular e tem sido intimamente correlacionado à inflamação. Tratamentos usuais do câncer, como quimioterapia e radioterapia, apresentam elevados efeitos adversos ao paciente, além do alto custo. Tendo em vista que a maior parte das drogas antineoplásicas produzidas são oriundas de compostos naturais ou de seus derivados, é constante a busca por novos metabólitos de origem natural, em especial os de origem vegetal - que apresentam potencial na busca por novas moléculas para síntese de fármacos. Diversos fitocomponentes, como o terpeno α -terpineol (TPN), apresentam efeito antiproliferativo e anticancerígeno em linhagens de adenocarcinoma de mama, próstata e ovário, e leucêmicas. Neste trabalho foi avaliado o potencial anti-proliferativo do TPN frente à seis linhagens tumorais humanas (A549, MCF-7, HT-29, Caco-2, LNCaP, ACP-03), sendo a A549 (câncer de pulmão) selecionada para experimentos de tratamento repetido por seis dias em associação com o quimioterápico doxorrubicina (DOXO). O mecanismo de morte celular, marcadores moleculares, atividade enzimática (JAK-3, JNK-3, p38- α), migração celular e inibição de TNF- α foram avaliados. Dentre as seis linhagens analisadas, três (A549, MCF-7, HT-29) apresentaram redução significativa da viabilidade celular após tratamento com o TPN por 48 h. A associação do TPN com a DOXO na linhagem A549 potencializou o efeito anti-proliferativo em comparação com a DOXO. Após seis dias de tratamento observou-se comportamento dose- e tempo-dependente da DOXO e do TPN sem apresentar diferença estatística entre eles. O TPN apresentou atividade inibitória da p38- α ($IC_{50}=729 \mu M$) e JAK3 ($IC_{50}=6,3 \mu M$). Após 48 h de tratamento, observou-se necrose nas células tratadas com DOXO (21,5 %) e TPN (7,3 %). Com a associação de ambas as drogas, a taxa de necrose elevou-se para 33,5 %, bem como para os seis dias de tratamento (52,3 %). Observou-se ainda, redução da migração celular após 120 h de tratamento com o TPN em comparação ao controle. Com base no exposto acima, o TPN apresenta potencial como biomolécula para o desenvolvimento de novos fármacos ou mesmo seu uso, como coadjuvante no tratamento de câncer de pulmão humano.

Palavras-chave: α -terpineol; A549; câncer; JAK3, p38- α

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, with lung cancer as the major one. In Brazil, lung cancer is the second leading cause of cancer deaths in men (after the prostate cancer) and fourth in women. Rio Grande do Sul is the second Brazilian state with the highest incidence of cancer. Characterized by disordered cell growth, tumor development is defined by cell death evasion and has been closely correlated to inflammation. Standard cancer treatments, such as chemotherapy and radiotherapy, cause adverse effects on patients. Considering that most of the antineoplastic drugs produced are derived from natural compounds or their derivatives, natural products (especially those of plant origin) present potential in the search for new molecules for drug synthesis. Several phytoconstituents, such as the terpene α -terpineol (TPN), have antiproliferative and anticancer effects in cell lines of breast, prostate and ovary carcinomas, and leukemic cells. In the present study, the antiproliferative potential of TPN on six human tumor cell lines (A549, MCF-7, HT-29, Caco-2, LNCaP and ACP-03) was evaluated. The A549 cell line (lung adenocarcinoma) was selected for experiments of six days with TPN and doxorubicin (DOXO) co-treatment. Mechanisms of cell death, molecular markers, enzymatic activity (JAK-3, JNK-3, p38- α), cell migration and inhibition of TNF- α were evaluated. Among the six lines, three of them (A549, MCF-7, HT-29) have shown a significant reduction of cell viability after 48 h treatment with TPN. Co-treatment of TPN and DOXO on A549 potentiated the antiproliferative effect compared with DOXO treatment. After six days of treatment, dose and time-dependent effect of DOXO and TPN were observed. TPN showed inhibitory activity on p38- α ($IC_{50} = 729 \mu M$) and JAK3 ($IC_{50} = 6.3 \mu M$). After 48 h of treatment, necrosis was observed in cells treated with DOXO (21,5 %) and TPN (7,3 %). The co-treatment of both drugs increased the necrosis rate up to 33,5 %, as well in the 6th day of treatment (52,3 %). It was also observed a cell migration reduction after 120 h of TPN treatment in comparison with control. Based on that, TPN can be characterized as a potential biomolecule for new drugs development or even its use as adjuvant in the treatment of lung adenocarcinoma.

Keywords: α -terpineol; A549; cancer; JAK3, p38- α

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição por sexo dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados	16
FIGURA 2: Microambiente tumoral e tumor associado à macrófagos (TAM).	18
FIGURA 3: Classificação estrutural e domínios das caspases..	21
FIGURA 4: Via extrínseca e intrínseca da ativação da apoptose.	22
FIGURA 5: Via de ativação da p38 MAPK..	295
FIGURA 6: Estrutura do alfa-terpineol, (6)-gingerol, (6)-paradol e zerundone.	29
FIGURA 7: <i>Screening</i> da viabilidade de linhagens tumorais humanas..	38
FIGURA 8: Curva de dose da doxorrubicina em células A549.	39
FIGURA 9: Avaliação da viabilidade de células A549 tratadas com α -terpineol e doxorrubicina.	40
FIGURA 10: Efeito da associação de doxorrubicina e α -terpineol em células A549.	40
FIGURA 11: Efeito crônico da associação de doxorrubicina e α -terpineol em células A549.	42
FIGURA 12: Efeito crônico da associação de doxorrubicina e α -terpineol em células A549.	42
FIGURA 13: Citotoxicidade de α -terpineol em células A549..	43
FIGURA 14: Alterações morfológicas após 48 h e 144 h de tratamento com o α -terpineol (TPN).	44
FIGURA 15: Potencial inibitório <i>in vitro</i> de α -terpineol sobre a atividade das proteínas p38- α , JAK-3 e JNK-3.	45
FIGURA 16: Efeito do α -terpineol sobre a liberação de TNF- α em células A549.	46
FIGURA 17: Efeito do α -terpineol sobre a liberação de TNF- α em sangue total humano.	46
FIGURA 18: Efeito do α -terpineol sobre a liberação de TNF- α em macrófagos Raw 264.7.	47
FIGURA 19: Efeito do α -terpineol sobre a morte programada de células A549.	48
FIGURA 20: Efeito do α -terpineol sobre a morte programada de células A549.	49
FIGURA 21: Análise da migração celular em A549 após 120 h de exposição ao TPN.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD – 7-amino-actinomicina D

AKT1 – “V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1”

Apaf-1 – “Apoptotic protease activating factor 1” - Fator apoptótico ativador de proteases-1

APS – Persulfato de amônio

BCL-2 – “B-cell lymphoma 2” – Linfoma de célula B-2

BSA – “Bovine serum albumin” – Soro de albumina bovina

CARD – “Caspase recruitment domains” - Domínio de recrutamento de caspases

DED – “Death effector domain” - Domínio efetor de morte

DMEM – “Dulbecco's modified Eagle Medium”

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOXO – Doxorubicina

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazila

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” – ensaio de imunoabsorção enzimática

ERK – Extracellular signal-regulated kinase

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FMCA – “Fluorometric microculture cytotoxicity assay” - Ensaio de citotoxicidade de microcultura fluorométrica

IACR – “International Agency for Research on Cancer”- Agência Internacional de Pesquisas em Câncer

IL-6 – “Interleukin-6” – Interleucina-6

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INCRT – Rede Internacional de Tratamentos e Pesquisas em Câncer

JAK-3 – “Janus kinase 3” - Janus Cinase 3

JNK-3 – “c-Jun N-terminal kinase 3”

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – “Mitogen Activated Protein Kinases” - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NF- κ B – “Nuclear transcription factor kappa B” – fator de transcrição nuclear kappa B

NS – Não significativo

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – “3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate” – hidrato de diaminobenzidina

p38- α – “Mitogen-activated protein kinases α ” - proteína quinase ativada por mitógeno

PDGF – “Platelet-derived growth factor” - fator de crescimento derivado de plaquetas

PI – Iodeto de propídio

PRR – “Pathogen recognition receptors”- receptores de reconhecimento de patógenos

PTK – Proteína tirosina quinase

ROS – “Reactive Oxygen Species” - Espécies Reativas de Oxigênio

RPMI – “Roswell Park Memorial Institute”

RIPK1 – “receptor 1 interaction protein”- proteínas de interação ao receptor 1

SDS-PAGE – “Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis”- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio.

SFB – Soro fetal bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TAM – Tumores Associados à Macrófagos

TNF- α – “Tumor necrosis factor α ” - Fator de Necrose Tumoral α

TPN – α -terpineol

VEGF – “Vascular endothelial growth factor” - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Tema	13
1.2 Problema.....	13
1.3 Hipótese.....	13
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo Geral	13
1.4.2 Objetivos específicos.....	13
1.5 Justificativa.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Câncer.....	15
2.2 Inflamação e a carcinogênese	17
2.3 Morte celular.....	19
2.3.1 Apoptose e necrose.....	19
2.3.2 Caspases	20
2.4 p38 MAPK.....	23
2.5 p38- α , JAK-3, JNK-3	25
2.6 Tratamentos usuais no câncer.....	26
2.7 Produtos naturais no desenvolvimento de fármacos.....	28
2.7.1 α -terpineol (TPN)	29
2.7.2 Potencialização do efeito terapêutico de quimioterápicos.....	31
2.8 Cultivo celular e linhagens	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Linhagens celulares	33
3.2 Reagentes.....	33
3.3 Tratamento das células	34
3.3.2 Tratamento repetido.....	34

3.3.3 Tratamento único com reposição de meio de cultivo	34
3.3.4 Tratamento para análise por citometria de fluxo	35
3.4 Viabilidade celular.....	35
3.4.1 Método MTT	35
3.4.2 Citotoxicidade por exclusão com azul de tripan.....	35
3.5 Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo	36
3.7 Inibição enzimática.....	36
3.8 Análise da inibição da liberação de TNF- α em RAW 264.7 e sangue total.....	37
3.9 Migração celular	37
 4. RESULTADOS	 38
4.1 <i>Screening</i> da viabilidade celular pós tratamento com α -terpineol.....	38
4.2 Associação do α -terpineol com quimioterápico	39
4.3 Alterações morfológicas	43
4.4 Inibição enzimática.....	44
4.5 Liberação de TNF- α	45
4.6 Citometria de fluxo	47
 5. DISCUSSÕES.....	 51
 6. CONCLUSÕES.....	 56
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 57

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM TERPENO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO (A549)

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado e patológico das células e representa uma das principais causas de mortes no mundo. Além de apresentar alto índice de mortalidade, a incidência do câncer é crescente. Em 2012, ocorreram cerca de 14,9 milhões de casos de câncer no mundo e estima-se que esse número aumente em 70% nas próximas duas décadas (OMS, 2012; EID et al., 2015). Ainda, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), cerca de 8,2 milhões de mortes por câncer ocorrem a cada ano. Segundo o INCA (2017), no Brasil, são estimados 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2016/2017, sendo o câncer de próstata, de pulmão e colorretal aqueles com maiores estimativas para homens e o de mama, colorretal, cólon de útero e pulmão, para as mulheres, respectivamente. Os tratamentos usuais no combate ao câncer são a radioterapia, quimioterapia e a cirurgia. Tais métodos apresentam efeitos adversos aos pacientes (SAEED et al., 2015) e às vezes resistência do fármaco ao tratamento, sendo assim a busca por novas drogas é de grande interesse.

Tendo em vista que a maior parte das drogas antineoplásicas produzidas são de origem natural ou de seus derivados (NEWMAN e CRAGG, 2016), evidencia-se o potencial dos metabólitos oriundos de plantas no desenvolvimento de novos fármacos. Os primeiros medicamentos antineoplásicos derivados de produtos naturais, como o paclitaxel (Taxol®) (EID et al., 2015) e o etoposídeo (Etopophos®) comprovam a aplicabilidade e eficácia desses metabólitos no tratamento do câncer. Entre os metabólitos oriundos de produtos naturais destacam-se os de origem vegetal como, por exemplo, os componentes extraídos de óleos essenciais como os terpenos α -terpineol (TPN) e (6)-gingerol, os quais apresentam atividade antiproliferativa em linhagens tumorais, além dos efeitos antioxidante, anti-inflamatório e desinfetante (KAUR e VERMA, 2015; DUGASANI et al., 2010).

1.1 Tema

Investigação da atividade biológica de α -terpineol em células tumorais em associação ou não com quimioterápico.

1.2 Problema

O α -terpineol apresenta efeito antiproliferativo em células tumorais *in vitro*? E quando administrado o α -terpineol simultaneamente com o quimioterápico doxorrubicina, potencializa-se esse efeito?

1.3 Hipótese

O α -terpineol tem efeito antiproliferativo em células tumorais *in vitro*; e, quando administrado simultaneamente com o quimioterápico doxorrubicina, potencializa-se esse efeito.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade biológica de α -terpineol em células tumorais *in vitro*, na ausência e em associação com quimioterápico.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do TPN na viabilidade de células humanas de carcinoma de próstata (LNCaP), linhagem de câncer de pulmão de pequenas células (A549), adenocarcinoma colorretal (Caco-2 e HT-29), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e adenocarcinoma gástrico (ACP-03) após tratamento com α -terpineol;
- Avaliar o evento de morte celular na linhagem que apresentar maior potencial antiproliferativo;
- Observar o efeito da repetição de dose por 48, 96 e 144 h;
- Avaliar o potencial inibitório do TPN frente à JAK-3, JNK3, p38;
- Verificar a migração celular das células tratadas com α -terpineol;
- Avaliar o efeito do TPN na inibição da liberação de TNF- α ;

1.5 Justificativa

É crescente o número de casos de cânceres no mundo, bem como os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com tratamentos oncológicos que chegaram a R\$ 2,4 bilhões em 2012, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Os altos custos e significativos efeitos adversos resultantes dos tratamentos usuais para a terapia do câncer (como radioterapia e quimioterapia), corroboram com a necessidade da busca por novos medicamentos com reduzidos efeitos colaterais, fácil obtenção e baixo custo. Tendo em vista que cerca de 80% das drogas anticancerígenas desenvolvidas nos últimos 30 anos são oriundas de produtos naturais ou de seus derivados semi-sintéticos/sintéticos, o emprego de compostos naturais na prevenção e tratamento de doenças mostra-se promissor. Dentre os produtos naturais, algumas plantas têm apresentado resultados satisfatórios em estudos *in vitro*, demonstrando efeitos antiproliferativo e anticancerígeno, por exemplo.



Certos componentes de plantas, devido suas propriedades farmacológicas, são possíveis candidatos para a criação de novos fármacos para a terapia de diversos tipos de cânceres. Existem resultados interessantes na literatura relacionando a atividade de α -terpineol com o efeito antiproliferativo e anticancerígeno em linhagem de adenocarcinoma de mama, leucemia mielóide crônica através da supressão da via NF- κ B. Ainda, experimentos evidenciaram que quimioterápicos, na presença de compostos naturais, podem ter seu efeito anticancerígeno intensificado, o que é muito interessante quando se trata da resistência a quimioterápicos. Baseado nessas evidências científicas e estudos que atribuem ao α -terpineol funções anticancerígenas, a hipótese principal deste trabalho é que o α -terpineol desempenha efeito antiproliferativo em células tumorais. Ainda, quando administrado o α -terpineol simultaneamente com o quimioterápico doxorrubicina, exacerba-se esse efeito.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

Caracterizado pelo crescimento exacerbado e desordenado das células, o câncer trata-se da segunda principal causa de mortes no mundo, depois das doenças cardiovasculares (CDC, 2016). Segundo dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 8,2 milhões de pessoas chegam à óbito a cada ano, acometidas por algum tipo de câncer - estimativa esta, que representa 13% do total de mortes no mundo (OMS, 2016). No Brasil, o câncer de próstata é o principal responsável pelas mortes por câncer em homens, seguido de câncer de pulmão e colorretal, sendo o câncer de mama o mais recorrente em mulheres e que apresenta maior índice de mortalidade, seguido de câncer de colorretal e cólon de útero (INCA, 2017). Ainda, são estimados para o ano de 2016, cerca de 295 mil novos casos de câncer em homens, tendo como localização primária a próstata, seguido de câncer de traqueia, brônquios e pulmão, colorretal (FIGURA 1). Para mulheres, são estimados cerca de 300 mil novos casos de câncer para 2016, sendo o de mama mais prevalente, seguido de colorretal, cólo do útero e câncer de pulmão (INCA, 2017).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Rio Grande do Sul é o Estado brasileiro que apresenta maior estimativa de número de casos de câncer para 2016, cerca de 588 novos casos a cada 100 mil homens e 451 casos a cada 100 mil mulheres. Segundo dados da OMS (2012), cerca de 47% das mortes por câncer ocorrem em países em desenvolvimento devido, provavelmente, aos atrasos no diagnóstico da doença o que resulta num estado avançado, grave e até letal do câncer quando diagnosticado. A OMS estima que em 2030 haja cerca de 23 milhões de casos de câncer sendo 68% deles em países em desenvolvimento. Também, segundo a Sociedade Americana de Câncer (2010), o custo econômico global resultante da incapacidade ou morte dos indivíduos acometidos por essa patologia chega a 900 bilhões de dólares por ano.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 1: Distribuição por sexo dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, exceto casos de câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA, 2017

Diferentemente das células saudáveis que crescem, multiplicam-se e morrem de maneira ordenada por processos naturais e contínuos, as células cancerígenas se desenvolvem de maneira desordenada e desregulada, invadindo outras células e tecidos, desencadeando a patologia do câncer (RAKOFF-NAHOUM et al., 2006). Por se tratar de doença multifatorial, várias são as causas que podem corroborar no desenvolvimento do câncer. Apenas 5-10 % de todos os cânceres são resultantes de defeitos genéticos hereditários, sendo os fatores ambientais os agentes que contribuem na promoção da carcinogênese. Alguns exemplos desses fatores são: químicos (tabagismo e alcoolismo); agentes físicos (raio ultravioleta); agentes biológicos (infecção por vírus, envelhecimento e dieta) (ANAND et al., 2008). Ainda, o desenvolvimento de câncer requer propriedades fundamentais como a autoproliferação, perda da sensibilidade aos sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, manutenção da vascularização e a invasão de tecidos/metástase (RAKOFF-NAHOUM, 2006; HANAHAN et al., 2000).

Em se tratando de câncer de pulmão, os dados mais recentes da GlobalCan (2012) reportam que o câncer de pulmão é o primeiro mais incidentes no mundo (seguido de mama, intestino e próstata), considerado localização primária mais frequente em homens e terceiro em mulheres (depois de mama e intestino). Mundialmente, entre os diversos tipos de câncer, este representa 12,8 % dos casos e 17,8 % das mortes devido essa doença, sendo sua incidência superior em países mais desenvolvidos como o norte da Europa e América, intimamente relacionada ao tabagismo (HOFFMAN; MAUER; VOKES, 2000). Dentre os fatores de risco destacam-se o tabagismo (responsável cerca de 90 % das mortes de câncer de pulmão em mulheres e 80% em homens) devido aos compostos carcinogênicos do tabaco (RIDGE; MCERLEAN; GINSBERG, 2013). Em segundo lugar está o radônio (PAWEL;

PUSKIN, 2004) cuja exposição de indivíduos à solos contaminados, podem ter seu efeito potencializado pelo sinergismo com a inalação do tabaco. Além do radônio, outros químicos como sílica, cromo, cádmio, níquel, arsênico e berílio (NEUBERGER; FIELD, 2003) foram relacionados como fatores de risco. Ainda, portadores de HIV e a inalação passiva do tabaco através da convivência com fumantes estão caracterizados como fator de risco da doença (ENGELS et al., 2008). Alguns fatores como inflamação, falhas a nível molecular e sinalizações intercelulares alteradas, são desencadeadoras ou auxiliadoras na patogênese do câncer.

2.2 Inflamação e a carcinogênese

A inflamação está diretamente relacionada com o desenvolvimento do câncer, desde a iniciação até o crescimento tumoral, invasão, progressão e metástase (HOENERHOFF et al., 2015). As primeiras relações entre a inflamação crônica e o câncer datam de 1863 quando o pesquisador Virchow observou que a presença de leucócitos infiltrantes em tecidos era a marca registrada de tumores neoplásicos (BALKWILL et al., 2001). O microambiente inflamatório está presente nos tumores e é caracterizado pela presença de leucócitos do hospedeiro, tanto nos tumores como no estroma, sendo alguns linfócitos podem contribuir para o avanço do câncer e sua disseminação (ALLEN et al. 2015; NEGUS et al., 1997).

Algumas citocinas inflamatórias podem influenciar na sobrevivência, crescimento, diferenciação e na interação de células tumorais com a matriz extracelular (STARK et al., 2015). Uma variedade de mediadores inflamatórios contribui para o microambiente que resultará no desenvolvimento, invasão e metástase do câncer como, por exemplo, a interleucina IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α), os quais contribuem na estimulação do crescimento tumoral, inibição de mecanismos de reparo do DNA bem como nas respostas inflamatórias (GRIVENNIKOV et al., 2010). Esse microambiente é definido através da ocorrência de eventos como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos e leucócitos, ao dano celular, degeneração, morte celular, angiogênese estimulada por citocinas e fatores de crescimento (HAO et al., 2012). Estudos epidemiológicos demonstraram que microambiente rico em macrófagos promove tumores mais agressivos e com maior potencial metastático (NARDIN et al., 2008). Ocorre então o aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , fator de transcrição NF- κ B, recrutamentos macrófagos e estímulos à angiogênese (VEGF, PDGF) os quais são importantes reguladores da

tumorigênese, associados à progressão tumoral (QIAN et al., 2010). As células tumorais e do estroma produzem fatores de crescimento que induzem monócitos a se diferenciar em macrófagos (HAO et al., 2012). No tumor, esses macrófagos expressam citocinas, quimiocinas e proteases que promovem a angiogênese, metástase e imunossupressão (FIGURA 2). Ocorre o aumento da proliferação celular, crescimento tumoral e o remodelamento da matriz. Esses eventos, somados as alterações genéticas e epigenéticas (necessárias para progressão de células iniciadoras), faz com que ocorra o desenvolvimento tumoral (GRIVENNIKOV et al., 2010).

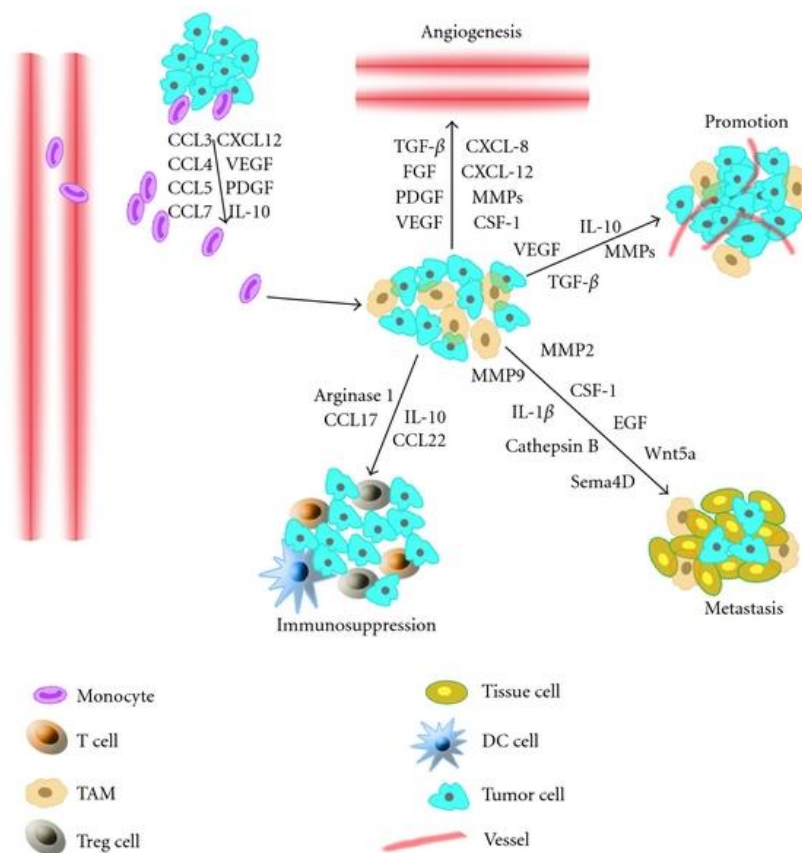


FIGURA 2: Microambiente tumoral e tumor associado à macrófagos (TAM) na progressão tumoral. Citocinas promovem angiogênese, metástase e imunossupressão tumoral. Fonte: HAO *et al.*, 2012.

Segundo Kalkwill e colaboradores (2001), os processos inflamatórios também são retratados como cofatores de alguns cânceres como, por exemplo, o estímulo da esquistossomose no desenvolvimento de câncer de bexiga e doença inflamatória do intestino no desenvolvimento de câncer colorretal (BALKWILL et al. 2001). Segundo a Sociedade Americana de Câncer (2007), cerca de 17,8 % dos casos de cânceres no mundo têm sua causa relacionada à agentes infecciosos (PARKIN et al., 2006), como a gastrite crônica pelo

Helicobacter pylori levando ao desenvolvimento de câncer gastrointestinal (COUSSENS e WERB, 2002), sendo que 12,1% dessa estimativa, correspondem à infecções virais como o papilomavírus no desenvolvimento de câncer cervical (SMITH et al., 2007). Em estudo epidemiológico relacionando agentes infecciosos com prostatite (inflamação na próstata), foram identificados *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Enterobacter agglomerans*, *Haemophilus parainfluenza* e *Staphylococcus coagulase negativa* em pacientes com prostatite (GREENBERG et al., 1985). Ainda, patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. foram relacionados com o desenvolvimento de prostatite, tanto aguda como crônica (VIDEČNIK et al., 2015).

2.3 Morte celular

São descritas na literatura atividades celulares que resultam na morte da célula: a apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica e senescência (GRIVICICH et al., 2007; DIMRI, 2005; OKADA et al., 2004; CASTEDO et al., 2004). Segundo Ricci e colaboradores (2006) as alterações na coordenação desses eventos celulares podem implicar na tumorigênese. Dentre esses processos, a apoptose e autofagia são consideradas controladas geneticamente ou “programadas”, sendo a autofagia um processo adaptativo e conservado evolutivamente (RICCI et al., 2006). A apoptose ocorre em resposta a um estresse metabólico por exemplo, resultando em degradação de componentes celulares (DANIAL et al., 2004). Já, a senescência trata-se de processo metabólico essencial para o envelhecimento, visto que através de programação genética, ocorrem o encurtamento dos telômeros e ativação de supressores tumorais (GRIVICICH et al., 2007). Então, após um determinado número de divisões, a célula entra em senescência e perde a capacidade proliferativa. A necrose e a apoptose são os dois principais eventos de morte celular (SHUH et al., 2013) e falhas nesses processos estão intimamente envolvidos na tumorigênese.

2.3.1 Apoptose e necrose

Para se preservar a homeostasia entre morte e proliferação celular, sinais apoptóticos apropriados devem ser mantidos bem como a integridade e estabilidade genômica deve ser conservada (GOLDAR et al., 2015). Algumas células evadem do controle de crescimento e diferenciação normal, adquirindo a capacidade de resistir à morte celular e se multiplicam de maneira exacerbada e desorganizada, tornando-se células tumorais. A resistência à apoptose é uma característica da maioria dos tumores malignos (FULDA, 2009; OKADA et al., 2004). Como características morfológicas ocorrentes na apoptose tem-se o encolhimento celular,

retração da célula - o que causa perda da aderência com a matriz extracelular e com células vizinhas - bem como a condensação da cromatina e fragmentação nucleossomal. Corpos apoptóticos são formados, fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processos inflamatórios (ZIEGLER et al., 2004).

Já, a necrose se caracteriza por mecanismo descontrolado que envolve a lise da membrana celular e consequente extravasamento de seu conteúdo - resultando em processos inflamatórios. Apesar da necrose ser muitas vezes descrita como consequência de estresse celular (mecânico, calor, choque osmótico), pode ainda ser induzida por outros estímulos. Interações com proteínas de interação ao receptor 1 (RIPK1) com RIPK3 formando complexo de sinalização de necrose ordenada – denominado “necroptose” (VANDEN BERGHE et al., 2013). A necroptose pode ser induzida por receptores de morte como FAS, TRAILR1, TNF receptor 1 e 2 e independente da ativação de caspases, diferentemente da apoptose. Apesar dos mecanismo pouco elucidados, a necroptose pode ainda ser resultante de processos de liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fatores citotóxicos de lisossomos e mitocôndrias, bem como por receptores de reconhecimento de patógenos (PRR) –que provocam inflamação e morte celular em resposta à esses estímulos (MARTINON et al., 2007).

2.3.2 Caspases

As caspases são enzimas proteolíticas amplamente conhecidas devido sua importância no controle da morte celular e inflamação. As caspases de mamíferos são divididas de acordo com sua função: as caspases apoptóticas como as caspase-2, -3, -7, -8, -9 e -10 e as caspases envolvidas em processos inflamatórios, caspases- 1, -4, -5, -11 e -12 (SHALINI et al., 2015). As caspases apoptóticas são subdivididas em iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e 10) e efetoras (caspase-3, -6, e -7) de acordo com a presença ou ausência de domínios de interação proteíno-específicas em relação a extremidade N-terminal (FIGURA 3). Dentre as caspases iniciadoras, as caspases-2 e -9 possuem o domínio de recrutamento de caspases (CARD) e as caspases-8 e -10 possuem o domínio efetor de morte (DED), sendo as caspases envolvidas na inflamação (-1, -4, -5, -11 e -12), possuidoras do domínio CARD. As caspases iniciadoras clivam as caspases efetoras ativando-as por intermédio de degradação de proteínas estruturais, ativação de enzimas e outras caspases efetoras (CHEN, et al., 2015; HU, et al., 2013).

Tanto as caspases iniciadoras quanto as efetoras, possuem função essencial na realização de cascatas apoptóticas e nas vias de sinalização (extrínseca e intrínseca) tendo

como objetivo iniciar o processo de morte celular (BOYCE et al., 2004). Sendo assim, as caspases desempenham papel crucial na homeostasia do organismo visto que promovem a morte celular e a perda de sua função pode resultar no desenvolvimento tumoral. Ainda, as caspases podem estar envolvidas na tumorigênese através de vias não-apoptóticas através da inibição da proliferação, invasão e migração celular (JAGER et al., 2010). As caspases podem atuar em vias de ativação da apoptose: a via intrínseca (via mitocondrial) e a via extrínseca (ativada extracelularmente).

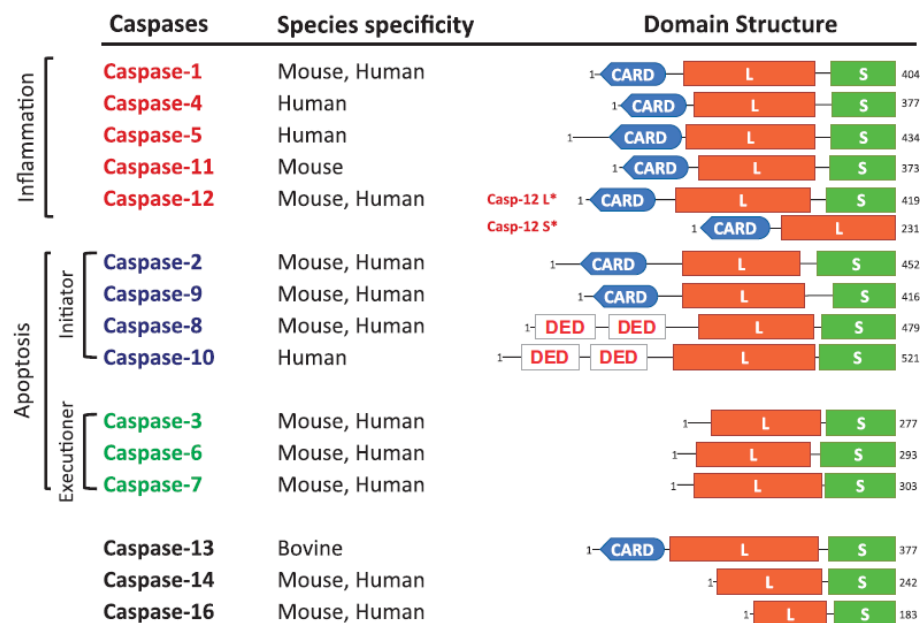


FIGURA 3: Classificação estrutural e domínios das caspases. Fonte: Shalini *et al.*, 2015.

A via extrínseca da apoptose é ativada por receptores de morte (receptores que contém sequência de 65 aminoácidos), os quais estão localizados na superfície celular e se ligam a ligantes extracelulares como o FasL e ao fator de necrose tumoral (TNF- α) através de proteínas adaptadoras. Essas moléculas adaptadoras recrutam caspase-8 que ativará caspase-3, resultando no evento da apoptose pela via extrínseca (FIGURA 4) (GRIVICICH et al., 2007; DANIEL et al., 2001). Ainda, a caspase-8 pode clivar proteínas dando origem à proteína BID truncada- tBID, a qual se desloca até a mitocôndria e provoca a liberação de citocromo c induzindo a via intrínseca de apoptose através da ativação de caspase-9 e posterior clivagem da caspase-3 (EID et al., 2015; OLA, et al., 2011).

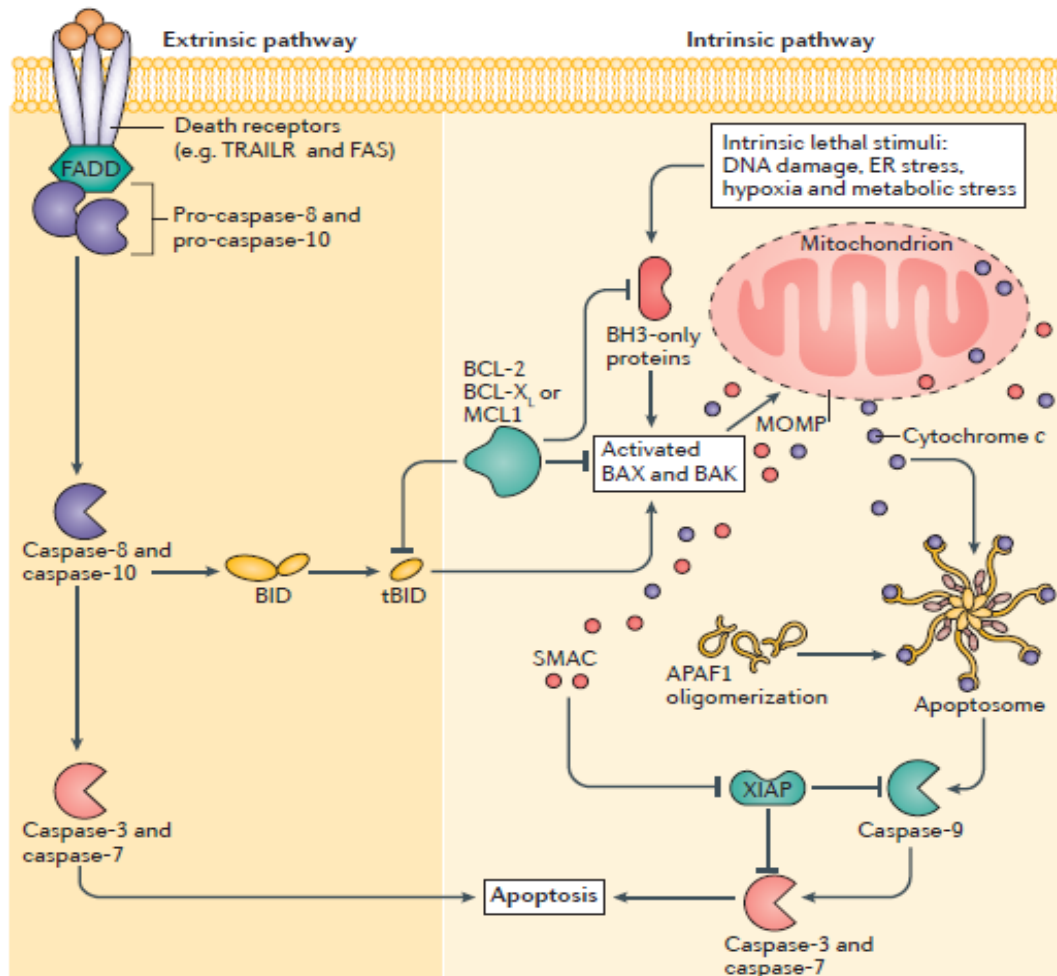


FIGURA 4: Via extrínseca e intrínseca da ativação da apoptose. Fonte: ICHIM et al., 2016.

A via intrínseca normalmente é ativada em resposta à por estímulos intracelulares como danos no DNA, altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como por infecção viral, ativação de oncogenes (RICCI et al., 2006), por hipóxia, ou estresse extracelular como privação de fatores de crescimento (GALUZZI et al., 2012). Esses sinais convergem à organela mitocôndria a qual recebe esses estímulos de morte celular e induz o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna. Com isso ocorre a alteração da permeabilidade mitocondrial, ruptura da organela e, por consequência, liberação de proteínas pró-apoptóticas nela presentes (GUPTA et al., 2003; DESAGHER et al., 2000).

A integridade mitocondrial pode ser controlada por membros da família BCL-2 a qual subdivide-se em duas categorias: as pró-apoptóticas (BAX, BID, BAK, BAD, NOXA e PUMA) e as anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCLW, MCL-1 e A1). Essas proteínas desempenham importante papel na regulação da morte celular programada através do equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Quando esse equilíbrio é rompido, contribui-se

para evasão da morte celular, característica de diversos tumores humanos (SCARFO e GHIA, 2013). O evento de inibição da morte celular foi demonstrado em experimentos *in vivo* com camundongos nocaute para o gene *bcl-2* os quais apresentaram morte celular exacerbada (OLA et al., 2011). A superexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 tem sido observada em diversos cânceres humanos, podendo ser resultado de translocações cromossômicas ou processamentos pós-traducionais errôneos. Embora essas translocações não ocorram comumente em tumores sólidos, é observado a superexpressão de BCL-2 em tumores de próstata e mama (CATZ et al., 2003}.

Durante a apoptose, as proteínas BAX e BAK sofrem dimerização e se inserem na membrana externa da mitocôndria, dando início à via intrínseca (MUKHOPADHYAY et al., 2014). Após a permeabilização da mitocôndria, ocorre o desacoplamento da cadeia respiratória e liberação de citocromo c para o citosol onde forma o complexo com o fator de ativação apoptótico (Apaf-1) e caspase-9 (FIGURA 4). Esse complexo Apaf-1/caspase-9 é denominado apoptossomo, o qual promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando caspase-9 ativa: a qual, por sua vez, ativa caspase-3 que resultará no evento apoptótico (YUAN et al., 2013; RUPNARAIN et al., 2004).

Os estudos envolvendo o processo de morte celular e sua correlação com o câncer tem contribuído na busca de novos alvos terapêuticos, importantes para o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos. Visto que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica, vários agentes quimioterápicos agem através da indução dessa morte celular (GRIVICICH et al., 2007; NICHOLSON, 2000). Sendo assim, é constante a investigação dos mecanismos moleculares da apoptose, envolvendo, por exemplo, proteínas da família BCL-2, p53, p38, NF- κ B e caspases, as quais se apresentam promissoras no estudo do câncer (GOLDAR et al., 2015).

2.4 p38 MAPK

A proteína p38 (MAPK) é um subgrupo das MAP quinases e participa de vários processos biológicos cuja transdução do sinal pode resultar em inflamação, morte celular, diferenciação celular e tumorigênese (ZARUBIN et al., 2005). As variantes da família p38 compreendem a p38- α , p38- β , p38- γ (ERK6, SAPK3) e a p38- δ (SAPK4). Dentre elas, a p38- α e p38- β são expressas ubiquitariamente e são responsáveis pela ativação de proteínas de choque térmico (hsps 25 e 27) e MK2. Enquanto a p38- γ e p38- δ são seletivamente expressas

e ativadas por ATF2. A isoforma p38- α tem papel essencial na produção de várias citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, que possuem efeitos pró-inflamatórios e angiogênicos (KUMAR et al., 2003), bem como papel regulatório na modulação de fatores de transcrição como NF- κ B (OECKINGHAUS et al., 2009). Ainda, a p38- α está diretamente relacionada com a invasão tumoral e angiogênese através da indução de metaloproteinases MMP1, MMP3 e MMP13 as quais regulam o remodelamento e degradação da matriz pelas células em metástase (KOUL et al., 2013).

A ativação de p38 pode ocorrer devido a estímulos extracelulares (FIGURA 5) como fatores de crescimento como CSF-1 (ZARUBIN et al., 2005); FOLTZ et al., 1997), estresse como choque osmótico, citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1) e luz ultravioleta (UV), desencadeando diferentes vias e fatores de transcrição como NF κ B, p53, ATF-2. A relação entre a ativação da via p38 e a inflamação foram evidenciadas em doenças inflamatórias do intestino, artrite reumatoide e Alzheimer (HOLLENBACH et al., 2004; JOHNSON et al., 2003). A ativação da via p38 participa na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), indução de enzimas como COX-2 (BADGER et al., 1998), expressão de enzimas intracelulares e proteínas aderentes como VCAM-1. Ainda, a p38 possui função regulatória na proliferação e diferenciação de células do sistema imune como GM-CSF, EPO, CSF e CD-40 (ZARUBIN et al., 2005; LEE et al., 1994).

Evidências do envolvimento da via p38 com a apoptose foram reportadas por Huang e colaboradores (1997), evidenciando que os inibidores da caspase podem bloquear a ativação da p38 por meio do *crosslinking* com a proteína Fas, sugerindo função de *downstream* da p38 na ativação das caspases (HUANG et al., 1997). Todavia, a ação da p38 na apoptose depende do tipo celular e do estímulo ocorrido: em algumas linhagens celulares a sinalização de p38 resulta na morte celular, enquanto em outras linhagens pode auxiliar na sobrevivência, crescimento e diferenciação celular (ZARUBIN et al., 2005).

A p38 apresenta função no processo de tumorigênese e senescência há relatos de que ativação de MKK6 e MKK3 levam a fenótipo de senescência dependente da atividade da p38 MAPK. A perda da senescência é uma característica comum das células tumorais e apresenta relação com a ativação da via p38. Segundo Wang e colaboradores (2002), a ativação de p38 MAPK foi demonstrada como responsável pela senescência em resposta do encurtamento dos telômeros, exposição a H₂O₂ e sinalização de oncogenes (WANG et al., 2002).

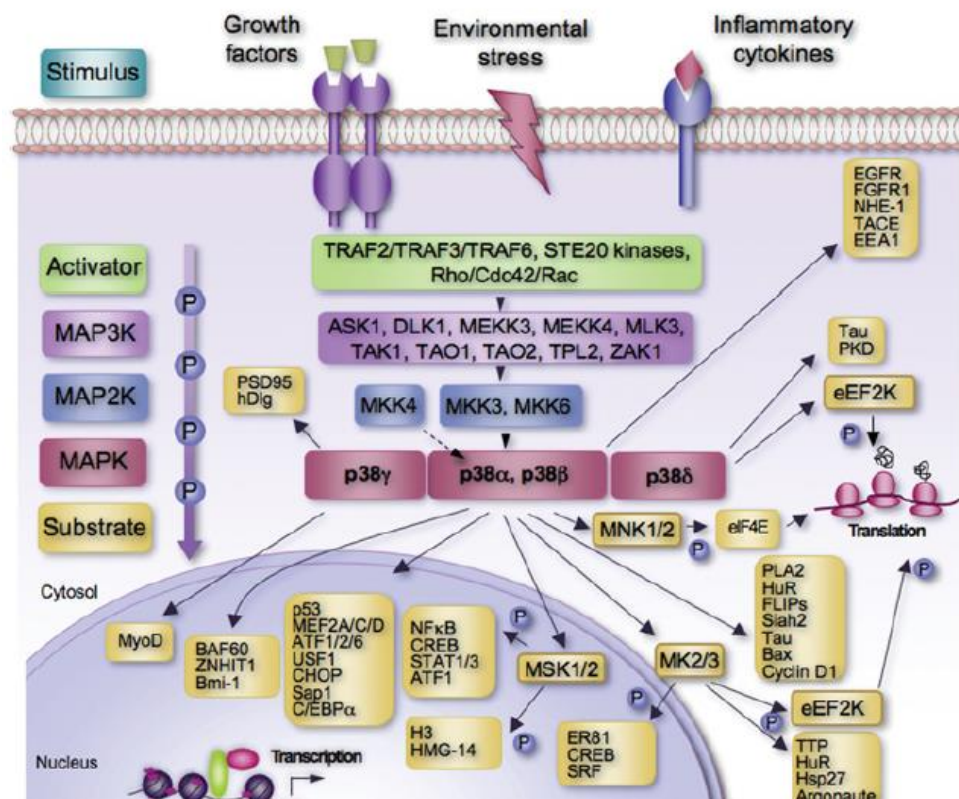


FIGURA 5. Via de ativação da p38 MAPK. Fonte: CUADRADO e NEBRED, 2010

2.5 p38- α , JAK-3, JNK-3

As proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) p38- α e a c-Jun N-terminal kinase JNK são ativadas por estímulos extracelulares como luz UV, enquanto a tirosina quinase JAK3, é ativada durante a inflamação. Essas enzimas estão intimamente envolvidas na progressão de doenças inflamatórias crônicas bem como na patologia de algumas doenças. Enquanto a JNK1 e JNK2 são expressas em muitos tecidos, a JNK3 é seletivamente expressa no cérebro sendo um marcador em doenças neurodegenerativas, mas presente também em testículos e coração (GOETTERT et al., 2011; BOGOYEVITCH E KOBE, 2006).

A proteína p38- α é expressa de forma ubiqüitária e está relacionada com a inflamação crônica (SELIG et al., 2012) e a JAK3 é seletivamente expressa em tecidos hematopoiéticos atuando em células do sistema imune (BAUER et al., 2014). Estudos de Hassan et al. (2010) envolvendo o TPN quanto ao efeito de inibição enzimática na concentração de 5,8 mM evidenciaram o potencial inibitório para JAK-3, AKT1 e JNK1 correlacionando à sua função anticâncer. Rios et al., (2012) observaram que o triterpeno curcubitacina é considerado inibidor seletivo da via JAK/STAT, evidenciando seu potencial como composto antineoplásico.

Ensaio envolvendo a folha de lótus bem como seus componentes majoritários (quercitinas e catequinas) demonstraram efeito anti-inflamatório pela via de inibição de JNK e NFkB, sugerindo sua aplicabilidade como agente anti-inflamatório (LIU et al., 2014). Moléculas capazes de inibir seletivamente quinases p38, JNKs, JAKs apresentam potencial como alvos contra tumores sólidos, hematopoiéticos e doenças inflamatórias crônicas (BUBICI e PAPA, 2013).

2.6 Tratamentos usuais no câncer

Atualmente a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia representam as principais ferramentas terapêuticas no tratamento de diversos cânceres (MACHADO, 2000; MURAD, 1996). A radioterapia e cirurgia conferem cura em um terço dos pacientes, quando o tumor ainda não se disseminou por metástase. Todavia, em caso de neoplasia é necessário a realização de procedimento sistêmico, a quimioterapia, que pode ser efetuada em 60-70 % dos casos (CHABNER B.A, LONGO D.L. 1996). A quimioterapia, segundo o INCA, trata-se de método que utiliza compostos químicos, denominados de quimioterápicos, que quando aplicados ao câncer, são chamados de quimioterápicos antineoplásicos. Uma desvantagem dos agentes utilizados no tratamento do câncer é a falta de seletividade, pois o agente afeta tanto as células tumorais quanto as células de tecidos saudáveis. O mecanismo de ação da maioria das drogas antineoplásicas ocorre pela interferência no mecanismo celular, modificando a função ou proliferação normal das células (DE OLIVEIRA J.C. et al., 2012).

Segundo o INCA (2006), os principais antineoplásicos utilizados no tratamento do câncer são os alquilantes (compostos capazes de substituir um átomo de hidrogênio por um radical alquil), comprometendo a replicação do DNA. Por exemplo, o alquilante ciclofosfamida age em todas as fases do ciclo celular; já os antimetabólicos como o metotrexato, inibem a biossíntese de componentes essenciais ao DNA prejudicando sua multiplicação e agem na fase S do ciclo celular; os antibióticos (substâncias que interagem com o DNA inibindo a síntese de ácido nucleico ou proteínas- não diferenciando entre células tumorais e saudáveis), como a actinomicina D; os inibidores mitóticos, que resultam na parada da mitose na fase de metáfase pois atuam na proteína tubulina a qual forma os microtúbulos (que são essenciais na formação do fuso e migração dos cromossomos), interrompendo assim, a divisão celular. Diversos efeitos adversos são observados na terapia convencional do câncer utilizando agentes quimioterápicos como náuseas, vômito e queda de cabelo, principalmente

devido a alta citotoxicidade e por não apresentarem seletividade, afetando além das células tumorais, também tecidos saudáveis. Esses efeitos adversos resultam em desconforto dos pacientes e, muitas vezes, a resistência à fármacos (SAEED et al., 2015).

No caso de câncer de pulmão, os tratamentos iniciais são a cirurgia (quando do estágio inicial da doença) partindo-se posteriormente para quimioterapia e radioterapia. Os tratamentos se direcionam de acordo com o tipo do tumor e estágio em que se encontra. Em tumores de não-pequenas células (NSCLC), responsável pela maioria de todos cânceres de pulmão (85%)(GADGEEL; RAMALINGAM; KALEMKERIAN, 2012), o objetivo é a cura em estágio I e II, enquanto em estágios mais avançados, o objetivo é paliativo a fim de prolongar a vida do paciente. Os tumores de pequenas-células (SCLC), representam cerca de 15 % dos casos sendo doença maligna com metástases precoces. O tratamento desses pacientes se direciona de acordo com o estágio, mas incluem radioterapia e quimioterapia com combinação de fármacos como cisplatina, etoposídeo, doxorrubicina intercalados com irradiações (GADGEEL et al., 2012). Na ausência de tratamento, os pacientes com SCLC apresentam prognóstico ruim podendo a sobrevida chegar a algumas semanas. Todavia, a combinação de quimioterápicos como ciclofosfamida, doxorrubicina e vincristina (CAV) resultaram em melhora significativa na resposta dos pacientes com taxa de 60-80% aumentando a sobrevida (LOWENBRAUN et al., 1979).

A doxorrubicina (DOXO) é um fármaco muito utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres (pulmão, mama, próstata, gástrico, intestino, fígado, ovário, leucemias (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013; ZHENG et al., 2015) sendo considerado uma das drogas mais potentes dentre os 132 quimioterápicos aprovados pelo Food and Drug (FDA) (CARVALHO et al., 2009). A DOXO apresenta como mecanismo de ação a inibição da topoisomerase I e II, intercalando-se ao DNA e impedindo a divisão celular (BOX, 2007) bem como a geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) (SABUNCUOGLU, 2014). Tal quimioterápico se trata de uma antraciclina de classe I não-seletiva que resulta em apoptose, necrose e senescência celular (TACAR, OKTAY, DASS, CRISPIN R. 2013). Apesar de seu amplo uso em diversos tumores, a DOXO apresenta resistência ao tumor e dose com toxicidade limitante, mas a associação desse quimioterápico com produtos naturais evidenciaram a reversão dessa resistência, potencializando o efeito da droga em A549 (POORNIMA et al., 2014).

2.7 Produtos naturais no desenvolvimento de fármacos

Desde os primórdios, a humanidade tem aplicado produtos encontrados na natureza para fins medicinais e curativos, o que instigou os cientistas a estudar o princípio ativo desses produtos e seus metabólitos secundários a fim de desenvolver medicamentos eficazes (EID et al., 2015). Cerca de 80 % das drogas antineoplásicas desenvolvidas nas últimas três décadas são oriundas de produtos naturais ou de seus derivados sintéticos, miméticos (NEWMANN e CRAGG, 2016). A primeira droga anticancerígena desenvolvida a partir de produto natural foi a podofilotoxina, isolado de *Podophyllum peltatum* em 1947, o qual possibilitou o advento de descobertas de outras drogas de origem natural: o paclitaxel (Taxol®), etoposídeo (Etopophos®), teniposídeo (Vumon®), vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) (COLEGATE et al., 2008). Tanto o paclitaxel, como a vimblastina (Velban®), interferem na estrutura e função dos microtúbulos, agindo em vias apoptóticas através de mecanismos que envolvem a expressão de proteínas da família BCL-2 (DOSTÁL e LIBUSOVÁ, 2014).

Os produtos naturais são amplamente encontrados na natureza, apresentam fácil acesso e aquisição, custo baixo e menos efeitos adversos quando administrados farmacologicamente. Além disso, os metabólitos provenientes das plantas apresentam baixa toxicidade e alto potencial de atividade biológica (MANGAL et al., 2013; CHIN et al., 2009). Os efeitos terapêuticos dos produtos naturais são evidenciados por suas propriedades antioxidantes, antiproliferativa e efeitos pró-apoptóticos em uma variedade de cânceres como leucemia, próstata, mama, cólorretal, cérebro, melanoma e pâncreas (LIU, et al., 2015). Sendo assim, apresentam-se como candidatos no desenvolvimento de novas drogas no tratamento do câncer. Segundo Newmann e Cragg (2012), a demonstração da atividade dos produtos naturais devido suas características estruturais e farmacoterapêuticas, continuam tendo grande relevância no descobrimento de novas drogas desde a década de 1997 até a atualidade.

Estima-se que apenas 5-15% das 250.000 espécies de plantas conhecidas já foram exploradas quanto sua atividade biológica (EID et al., 2015; KINGHORN et al., 1993), embora mais de 80% da população mundial utilizem plantas medicinais para fins terapêuticos (CORDELL, 2002). As principais classes de metabólitos secundários indicados como responsáveis pelo potencial anticancerígeno dos produtos naturais são os compostos fenólicos, (como flavonóides), esteroides e alcaloides (EID, et al., 2015). Estudos envolvendo extratos vegetais, demonstraram os efeitos de seus compostos, caracterizando-os com potencial antiproliferativo, antifúngico e anticancerígeno, como extrato de *Psidium guajava* L no potencial apoptótico em células de próstata e seu efeito na regulação negativa de metástase, proliferação celular e angiogênese (RYU et al., 2012). Ainda, Saeed e colaboradores (2015),

destacaram o potencial citotóxico e anticancerígeno de extratos de folhas da planta *Lawsonia inermis* L., das sementes da planta *Trigonella foenum-graecum* L. e da planta *Ambrosia marítima* L. Também, alguns óleos essenciais ricos em terpinen-4-ol, D-limoneno, espatulenol, α -carinol e β -elemeno têm apresentado ação anticancerígena (COMPAGNONE et al., 2010).

Kaur e Verma (2015) reportaram uma série de componentes naturais com fatores anticancerígenos presentes em mel, alho, vegetais, chá verde, café, uvas vermelhas dentre outros. Ainda, neste estudo, os autores elucidaram o efeito anticancerígeno em terpenos α -terpineol, (6)-gingerol, (6)-paradol e zerundone (FIGURA 6), componentes extraídos de *Hedychium coronarium*, popularmente conhecido como Lírio-do-Brejo, encontrado comumente no Nepal e Índia (KAUR e VERMA, 2015). Também, o gingerol apresentou efeitos inibitórios em câncer colorretal, bem como efeito antioxidante e anti-inflamatório (DUGASANI et al., 2010). Sendo assim, os óleos essenciais apresentam componentes com potencial anticâncer, anti-inflamatório, antioxidante, caracterizando-os como candidatos no desenvolvimento de novas terapêuticas do câncer.

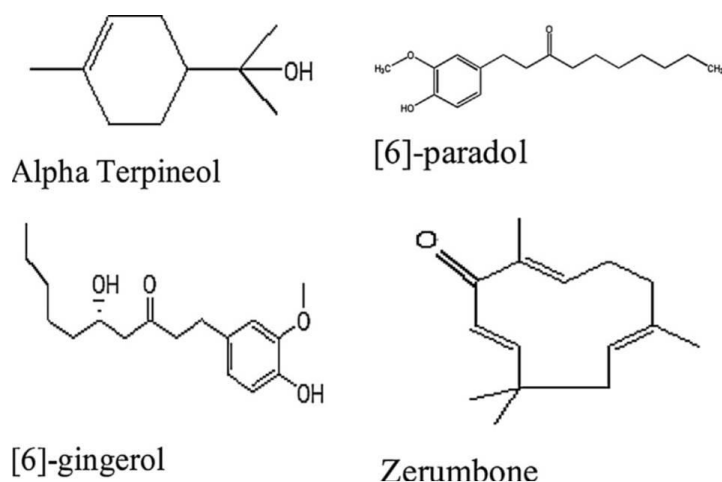


FIGURA 6: Estrutura do α -terpineol, (6)-gingerol, (6)-paradol e zerundone. Fonte: Kaur e Verma, 2015 (adaptado)

2.7.1 α -terpineol (α -TPN)

Os terpenos são compostos amplamente utilizados por indústrias de perfumarias e cosméticos como matérias-primas para conferir fragrâncias (DE SOUSA et al., 2007), em indústrias de produtos de limpeza como repelente de insetos (MIYAZAWA e OHSAWA 2002), desinfetante (CHEOL et al., 2004) e aromatizante (SINGER et al., 2006), em indústrias

farmacêuticas como antifúngico (PITAROKILI et al., 2002) e antisséptico (MIYAZAWA et al., 2002). O efeito anticancerígeno dos terpenos tem sido atribuído devido aos mecanismos de indução de enzimas das fases I e II do metabolismo carcinogênico; indução da apoptose e inibição de modificação pós-traducionais das proteínas de regulação de crescimento (WAGNER e ELMADFA, 2003; CROWELL, 1999).

O monoterpeno α -terpineol, componente de óleos essenciais de muitas espécies de plantas (QUINTANS-JUNIOR et al., 2011); DAGNE et al., 2000), apresentou atividade antibacteriana no caso do terpeno extraído *Cinnamomum longepaniculatum* (LI et al., 2014). O potencial antioxidante de α -terpineol foi observado por BICAS et al., (2011) e DAVALOS (2004), sugerindo ter potencial de conservante natural para alimentos. O efeito antimutagênico de α -terpineol extraído da uva foi observado por Di Sotto et al., (2013), sugerindo a aplicação desse componente como quimiopreventivo principalmente a prevenir dano genotóxico induzido por contaminantes ambientais. Ainda, Souza e colaboradores (2011) perceberam o efeito gastroprotetor dose-dependente de α -terpineol em experimento com camundongos modelo animal para úlcera gástrica, quando o componente foi administrado via oral.

Bicas et al., (2011), compararam a atividade antiproliferativa dos monoterpenos limoneno e α -terpineol e perceberam que o segundo (α -terpineol) foi bastante ativo contra adenocarcinoma de mama (linhagem MCF-7) e leucemia mieloide crônica (linhagem K-562) – neste o α -terpineol demonstrou maior especificidade quando comparado ao limoneno. Ainda, os autores analisaram os valores de TGI (valor do efeito citostático total), e inferiram que α -terpineol apresentou maior efeito do que o controle positivo (doxorrubicina), porém valor considerado ainda insuficiente para encorajar estudos em animais para validar seu efeito anticancerígeno *in vivo*. Concluiu-se que além de aplicação como composto aromático, o α -terpineol, demonstrou capacidade antioxidante e efeito citotóxico contra linhagens tumorais (mama, pulmão, próstata, ovário e leucêmica) (BICAS et al., 2011). Todavia quando comparado com o controle positivo doxorrubicina, a atividade antiproliferativa de α -terpineol foi considerada inferior (100 vezes menor), embora tenha demonstrado efeito muito semelhante ao limoneno (terpeno já reportado com atividade câncer-preventiva) (BICAS et al., 2011).

Células epiteliais de câncer de mama tratadas com α -terpineol por 6 h, regularam negativamente genes relacionados e regulados por NF- κ B, como IL-1 β , IL1R1, IFNG, ITK, EGFR, AKT1S1, TNF, TRAF6, BAG1 e BAG3 (HASSAN et al., 2010). Resultados de Hassan e colaboradores (2010) sugeriram que o α -terpineol induz apoptose de células

tumorais através de mecanismos que envolvem a inibição da atividade de NF- κ B. O tratamento com α -terpineol induz parada no ciclo celular e apoptose, sendo esse efeito dose-dependente e tempo-dependente. Ainda, os autores evidenciaram certa seletividade de α -terpineol sugerindo diminuição do risco de citotoxicidade contra células de pulmão saudáveis e linfócitos normais. Todos esses resultados, segundo Hassan e colaboradores (2010), indicam o α -terpineol como um composto potencialmente interessante para tratar tumores resistentes a drogas. Estudos envolvendo compostos naturais e seu efeito anticancerígeno são promissores e envolvem o α -terpineol - demonstrando o crescente interesse por esse terpeno na terapêutica do câncer (KAUR et al., 2015).

2.7.2 Potencialização do efeito terapêutico de quimioterápicos

Um dos desafios no tratamento do câncer é a resistência a drogas na quimioterapia, a qual pode ocorrer devido à desregulação da apoptose, mutações somáticas ou modificações do metabolismo de drogas (JONES et al., 2016). Algumas estratégias para minimizar esse fato têm sido estudadas, como, por exemplo, o uso farmacológico de compostos naturais concomitante à administração da droga resistente, a fim de potencializar-se o efeito anticancerígeno.

Nos estudos de Dias-Chávez e colaboradores (2013), células de câncer de mama (MCF-7) foram tratadas com composto resveratrol juntamente com o quimioterápico doxorrubicina (DOXO) tendo seu efeito terapêutico e indução da morte celular aumentados – sugerindo assim, seu possível efeito adjuvante na terapia do câncer de mama. O gene *hsp27* é frequentemente superexpresso em cânceres humanos resultando na inibição da morte celular e conferindo resistência à antineoplásicos como a doxorrubicina. Os autores reportaram que o resveratrol mediou *hsp27* regulando-o negativamente como também as proteínas envolvidas na apoptose e na resistência à drogas sensibilizando as células MCF-7 (tumorais de mama) ao tratamento com doxorrubicina. Eles atribuem ao resveratrol o aumento do efeito terapêutico da DOXO, provavelmente através da indução da apoptose. Também, Poornima e colaboradores (2014), observaram a potencialização do efeito apoptótico de células de adenocarcinoma pulmonar de pequenas células humano (A549), quando administrado a DOXO juntamente com neferina.

Ainda, Zhan e colaboradores (2014) evidenciaram em seus estudos com células de câncer de mama (MCF-7) o efeito antiproliferativo aumentado dessas células quando tratadas com o quimioterápico paclitaxel juntamente com o composto natural cúrcuma, demonstrando

o adição de efeito e indução da apoptose. Os autores atribuíram esse efeito à diminuição da expressão de BCL-2 e o aumento da expressão de BAX, bem como o bloqueio da sinalização de EGFR (ZHAN et al., 2014). Com isso, evidenciando novamente o efeito do aumento da atividade anticancerígena quando da administração simultânea de composto natural com quimioterápicos, sugerindo a possível redução de doses da droga, e consequentemente sua toxicidade - o que é vantajoso ao paciente.

2.8 Cultivo celular e linhagens

Com o advento de estudos *in vitro*, utilizando linhagens de células tumorais na investigação de tumores humanos, novos produtos terapêuticos e farmacológicos surgiram e surgem em busca de proporcionar melhores tratamentos aos pacientes (VERMEULEN et al., 2003). O Cultivo Celular, mesmo sendo um modelo de função fisiológica que apresenta algumas perdas das características da célula durante o desenvolvimento *in vitro* mostra-se vantajosa como modelo experimental (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). Além do controle do ambiente físico-químico (temperatura, CO₂, pressão osmótica), baixo custo em relação ao uso de modelos animais e a possibilidade de homogeneidade e constância das amostras, o cultivo *in vitro* recebe respaldo das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) que visam substituir o uso de animais em pesquisas (ALVES et al., 2008)

Cultivo primário de células se refere aos cultivos preparados diretamente a partir de um tecido ou órgão. Nesse processo as células estão vivas e conservam suas características originais sendo sua proliferação limitada, podendo ainda serem removidas do cultivo para formarem cultivos secundários (ALBERTS et al., 2010). Os cultivos secundários são aqueles em que as células foram repicadas, obtidas de um cultivo primário e proliferaram formando monocamadas, podendo ser subcultivadas por diversas vezes. As linhagens de células tumorais e a técnica de cultivo celular são essenciais na busca e desenvolvimento de novos fármacos e produtos biotecnológicos em prol da saúde humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagem de células humanas de adenocarcinoma pulmonar de pequenas células (A549), carcinoma de próstata (LNCaP), adenocarcinoma colorretal (Caco-2 e HT-29), adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma gástrico (ACP-03) e macrófagos murinos (Raw 264.7). A linhagem LNCaP foi fornecida pela professora Dr^a Ilma S. B. da Silva, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) estéril e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). A A549 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivada em meio RPMI 1640, 10% de SFB e 1% de antibióticos, assim como a ACP-03 (doadada pelo Dr. Diego Bonatto, Laboratório de Biologia Computacional e Molecular, UFRGS). A Caco-2 (adquirida do BCRJ) foi cultivada em meio DMEM baixa glicose, suplementado com 1% de aminoácidos, 10% de SFB e 1% de antibióticos, assim como a HT-29 (doadada por Dr. Eduardo Chiela, Departamento de Biofísica, UFRGS). As linhagens Raw 264.7 (adquirida do BCRJ) e MCF-7 (doadada por Dr. Eduardo Chiela) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em atmosfera de 5 % de CO₂ e 90 % de umidade, à temperatura constante de 37 °C.

3.2 Reagentes

O composto isolado α -terpineol (C₁₀H₁₈O, >96%; Sigma® St. Louis, EUA) foi adquirido comercialmente, sendo a alíquota estoque diluída à 40 mM em DMSO (Synth®) e armazenada à temperatura ambiente por 1 mês. A doxorubicina (98.0-102.0%, HPLC, Sigma®) foi diluída em DMSO até a concentração estoque de 10 mM e armazenada à -20°C.

Os meios de cultivo DMEM, RPMI-1640 foram adquiridos da Sigma® e o soro fetal bovino da Cultilab®. Os anticorpos primários utilizados foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology e os secundários da Cell Signalling. O kit de análise de morte celular por citometria “PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I” (BD Pharmingen™) e “SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain” foram comprados da ThermoFisher™. O MTT foi adquirido da Sigma®. Para o ensaio de liberação de TNF- α foi utilizado o kit comercial “Mouse TNF- α ELISA Ready-SET-Go!” (eBioscience®). Utilizou-se LPS/*E.coli* 0127:B8 (Sigma®) para estimulação das células.

3.3 Tratamento das células

3.3.1 *Screening* com diferentes linhagens celulares

As linhagens LNCap, MCF-7, A549, HT-29, Caco-2 e ACP-03 foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^3$ células/mL em uma placa de 96 poços, sendo 200 μ L/poço. Após 24 h (exceto para A549 e ACP-03, cuja incubação foi de 5 h) as células aderidas foram tratadas com α -terpineol na concentração de 200 μ M de TPN por 48 h, utilizando o veículo DMSO 0,5 % como controle negativo (células sem tratamento). Após o período de incubação, foi realizado teste de viabilidade celular por MTT (conforme item 3.4.1).

3.3.2 Tratamento repetido

Com base nos dados do *screening* selecionou-se a linhagem A549 para os posteriores experimentos devido sua capacidade de redução da viabilidade celular ($30 \pm 2,9$ %) após 48 h. Para o tratamento repetido, plaqueou-se de $2,5 \times 10^3$ células/mL em placa de 96 poços e após 5 h de adesão das células, tratou-se com o TPN (100 e 200 μ M) e a DOXO (1 μ M e 0,5 μ M) por 48 h, de forma isolada e em associação, utilizando o veículo DMSO 0,5 % como controle negativo (células sem tratamento). Após esse período, foi realizado renovação do tratamento após 48 h e 96 h e observado efeito até 144 h.

3.3.3 Tratamento único com reposição de meio de cultivo

Após dados do tratamento repetido, objetivou-se observar se o efeito na redução da viabilidade seria mantido após tratamento único seguido de substituição por meio de cultivo. Para o ensaio, as células foram tratadas e manipuladas conforme item 3.3.2, sendo substituído o tratamento por meio de cultivo nos períodos de 48 h e 96 h.

3.3.4 Tratamento para análise por citometria de fluxo

Para a análise de morte celular por citometria de fluxo, plaqueou-se as células na densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 12 poços. Após 5 h de adesão das células, o tratamento foi realizado com o TPN (200 μ M) e a DOXO (1 μ M) de forma isolada e em associação, por 48 h, utilizando o veículo DMSO 0,5 % como controle negativo (células sem tratamento).

3.4 Viabilidade celular

3.4.1 Método MTT

O teste por MTT é um ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica da célula. O princípio do método consiste na absorção do sal MTT pelas células, sendo ele reduzido à formazana, no interior da mitocôndria. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado (Mosmann, 1983). Para o teste, as células tratadas foram incubadas por 48 h e 144 h. Após o período de incubação, se desprezou o sobrenadante e se adicionou-se 200 μ L do corante MTT (5 mg/mL, Sigma®) dissolvido em meio, incubando-se as células por 3 h. Em seguida, o meio foi removido cuidadosamente e adicionado 200 μ L de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância das amostras mensuradas por espectrometria em leitor de ELISA (SpectraMax) a 570 nm.

3.4.2 Citotoxicidade por exclusão com azul de tripan

O corante azul de tripan adentra as células com membrana rompida corando-as de azul, enquanto as células viáveis permanecem translúcidas. Para este ensaio, 5×10^4 cél/mL foram adicionadas em placa de 48 poços e após o período de adesão (5 h), foram tratadas com 100 μ M e 200 μ M de TPN em associação ou não com DOXO 1 μ M por 144 h. Após, as células foram desprendidas da placa por tripsinização e realizada a contagem com fator de diluição (FD) 1:10 (10 μ M da suspensão celular foi adicionado à 90 μ M de azul de tripan). O número de células viáveis foi determinado pela média dos quadrantes da câmara de Neubauer, multiplicados pelo fator de diluição e fator da câmara (10^4), conforme fórmula abaixo:

$\text{Média n}^\circ \text{ cél no quadrante} \times \text{FD (10)} \times 10^4$

3.5 Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo

O ensaio de morte celular foi realizado por citometria de fluxo utilizando marcadores específicos de apoptose e necrose através do kit comercial PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD PharmingenTM). O marcador de fosfatidilserina (Anexina-V) é um marcador de células em apoptose, enquanto que o corante de DNA 7-AAD é usado para marcar células em necrose e em estágios finais da apoptose. Para o ensaio, as células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células em placas de 12 poços, tratadas com 200 μ M de TPN e DOXO 1 μ M sozinhos e associados, sendo feita análises após 48 h e 144 h de tratamento. Após o período de incubação, as células foram desprendidas da placa utilizando tripsina-EDTA (1,25 mM em PBS 1x, pH 7,4) na proporção 1:4, centrifugadas e o pellet ressuspensionado em 100 μ L do tampão para marcação do kit. Então, foram adicionados 2 μ L de 7-AAD e 2 μ L de anexina nas amostras, permanecendo um controle sem marcação e dois controles marcados com apenas um dos fluoróforos para compensação. As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro e analisadas em citômetro de fluxo (*BD Accuri C6*), através do *software BD AccuriTM C6*.

3.7 Inibição enzimática

A metodologia consiste em determinar o potencial inibitório dos diferentes extratos vegetais através da avaliação da fosforilação do substrato específico STAT3 da proteína JAK3 e a fosforilação do substrato ATF-2 da p38- α e JNK3, pelo método enzimático ELISA direto, utilizando anticorpos específicos. O potencial inibitório é inversamente proporcional à densidade óptica (absorbância). Resumidamente, foram utilizadas placas de 96 poços, incubadas com substrato ATF-2, por 18 h a 4°C. Após lavagem, foi adicionado tampão de bloqueio e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado a mistura de reação de quinase contendo a enzima. A reação p38- α foi realizada utilizando-se quinase (12 ng por poço), ATP (100 mM) e incubadas durante 60 min a 37°C. Para o ensaio da atividade de JNK3 foi usado quinase (10 ng por poço), ATP (1 mM) e 45 min de incubação a 37°C. A fosforilação de ATF-2 foi detectada com um anticorpo específico antifosfo ATF-2 (Thr69/71) (60 min a 37°C). Após cada período de incubação, a placa foi lavada três vezes com água destilada. A densidade óptica foi medida após a adição do substrato a 450 nm por ELISA.

3.8 Análise da inibição da liberação de TNF- α em RAW 264.7 e em sangue total humano

Para o ensaio de liberação de TNF- α , as células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 cél/mL em placas de 6 poços e incubadas por 24 h. Após, foram tratadas com o TPN e DOXO e incubadas por 1 h. Após o período de incubação do tratamento, lipopolissacarídeo (LPS a $1 \mu\text{g/mL}$) foi adicionado em cada amostra e incubado por 24 h antes da coleta do sobrenadante para análise. Da mesma forma, para análise em sangue total humano, as células foram plaqueadas e tratadas por 15 min antes da estimulação por LPS por 4 h, seguida da coleta do sobrenadante para análise. As amostras coletadas foram submetidas ao teste de ELISA. Após a adição do substrato, interrompeu-se a reação com solução “Stop Solution” (H_3PO_4 , 1M) e as amostras foram lidas em espectrofotômetro à 450 nm.

3.9 Migração celular

A migração das células de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, é fundamental para a metástase tumoral (BRAVO-CORDERO et al., 2012). Para o teste de migração celular, as células foram cultivadas (5×10^5 cél/mL) até atingirem confluência de 80 % em placas de 6 poços por 24 h. Após, foram feitos dois riscos transversais na monocamada com o uso de uma ponteira de 200 μL e adicionado o tratamento com TPN 100 μM e 200 μM e o veículo DMSO 0,5 % como controle. Esses riscos (duplicata) determinam uma descontinuidade da monocamada e as células que margeiam esse risco tenderão a migrar para o espaço vazio. As placas foram fotografadas com microscópio invertido de contraste de fase (Labomed, TCM400) no aumento de 200 x. As fotos obtidas foram avaliadas através do *software* TScratch (ETH Zurich) para cálculo de migração. O programa gera o valor percentual do fechamento da ferida para cada amostra, sendo posteriormente realizado manualmente o cálculo comparativo entre o controle (que representa 100 %) e o grupo tratado (% do controle a ser descoberto).

3.10 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do método estatístico Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 5, sendo adotado o nível de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1 *Screening* da viabilidade celular pós tratamento com α -terpineol

A fim de avaliar o potencial do α -terpineol frente a redução da viabilidade celular de linhagens tumorais humanas, realizou-se um *screening* utilizando o ensaio de MTT após tratamento com 200 μ M (dose estabelecida por protocolo padrão do laboratório) de TPN por 48 h. Dentre as seis linhagens analisadas, três delas apresentaram redução significativa da viabilidade celular: MCF-7 ($74 \pm 1,15$ %), HT-29 ($75 \pm 3,7$ %) e A549: ($70 \pm 2,9$ %) (FIGURA 7). Com base nesses resultados e, somado ao fato de não haver relato na literatura envolvendo α -terpineol e A549, selecionou-se esta linhagem para a continuidade dos experimentos.

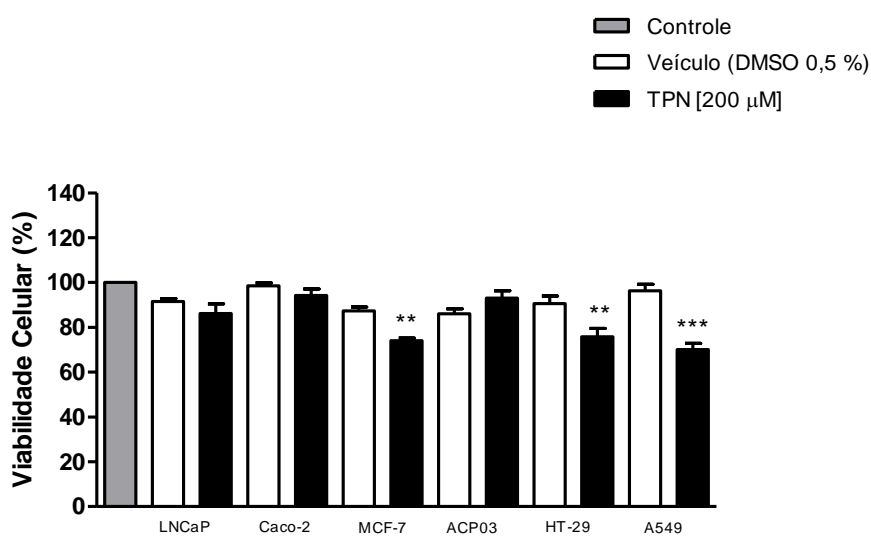


FIGURA 7: *Screening* da viabilidade de linhagens tumorais humanas. As células foram tratadas com 200 μ M de α -terpineol (TPN) por 48 h e a viabilidade avaliada pelo método MTT (n=3). Análise ANOVA (Bonferroni), **p<0,01; ***p<0,001 comparado ao veículo.

4.2 Associação do α -terpineol com quimioterápico

O quimioterápico doxorubicina foi escolhido para a realização dos experimentos de associação com o TPN. Primeiramente, foi realizada uma curva de dose para determinar a concentração a ser utilizada. As células A549 foram tratadas por 48 h com doses crescentes de DOXO, como apresentado na FIGURA 8. A dose de 1 μM do quimioterápico foi capaz de reduzir a viabilidade à 54 % ($\text{IC}_{50}=2,6 \mu\text{M}$), sendo selecionada para os experimentos de associação do TPN com a DOXO.

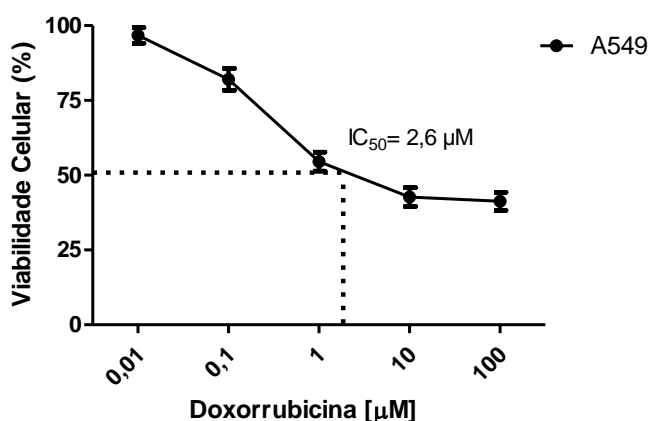


FIGURA 8: Curva de dose da doxorubicina em células A549. As células foram tratadas com doxorubicina em concentrações crescentes de 0,01 à 100 μM por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada por MTT (n=3).

Posteriormente, foi avaliado o efeito da associação entre o TPN e a DOXO em células A549. Com base no *screening* de viabilidade celular realizado em diferentes linhagens, foi utilizada concentração de TPN (200 μM) e a DOXO (1 μM). Além disso, avaliou-se uma concentração inferior do TPN (100 μM) para certificar a dose com melhor efeito. De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 9, o TPN à 100 μM reduziu a viabilidade das células para $89 \pm 1,9 \%$ após 48 h de tratamento, não apresentando diferença estatística em relação ao veículo. Já o TPN à 200 μM , por sua vez, reduziu à $68\% \pm 5 \%$ - semelhante à DOXO, que reduziu para $62 \pm 2 \%$. Em relação à associação, observou-se uma potencialização do efeito de redução da viabilidade na concentração de 100 μM ($53 \pm 1,8 \%$) e 200 μM ($49 \pm 1,8 \%$) de TPN.

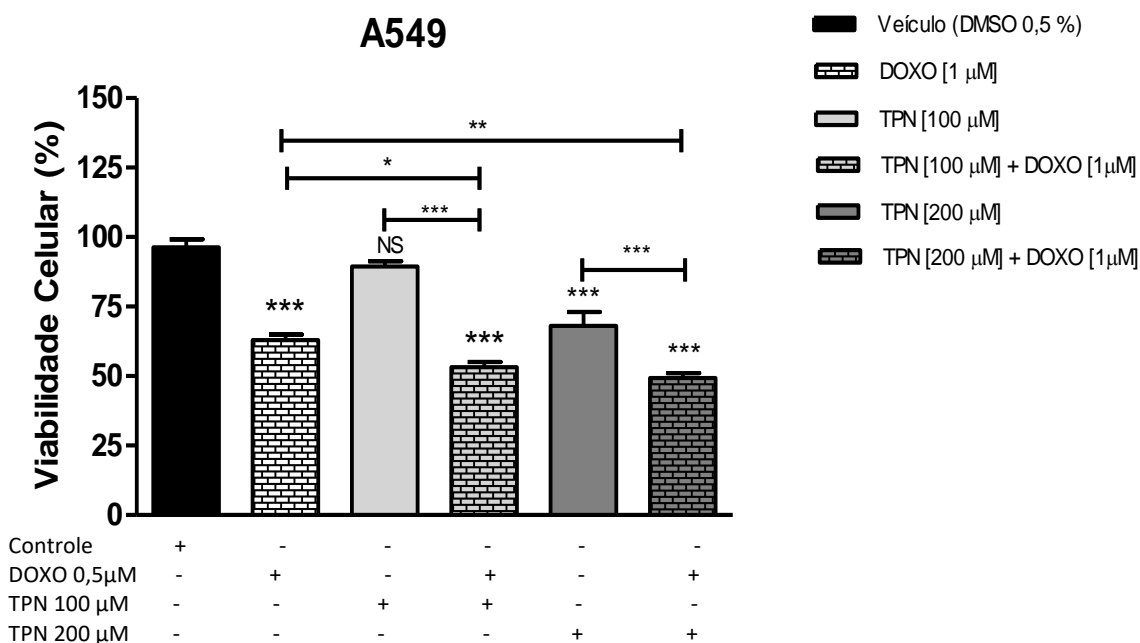


FIGURA 9: Avaliação da viabilidade de células A549 tratadas com α -terpineol e doxorrubicina. As células foram expostas aos compostos α -terpineol (TPN) e doxorrubicina (DOXO) por 48 h. A viabilidade foi avaliada pelo método de MTT. Análise ANOVA (Bonferroni), *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (n=4).

Visando a otimização e redução da dose de DOXO, reduziu-se a concentração a metade 0,5 μ M, associada com o TPN, a fim de reduzir a quantidade a ser utilizada. Apenas a concentração de 200 μ M de TPN, quando associado à DOXO 0,5 μ M ($65 \pm 4,3$ %), apresentou diferença estatística em relação à DOXO 0,5 μ M (79 ± 4 %) (FIGURA 10).

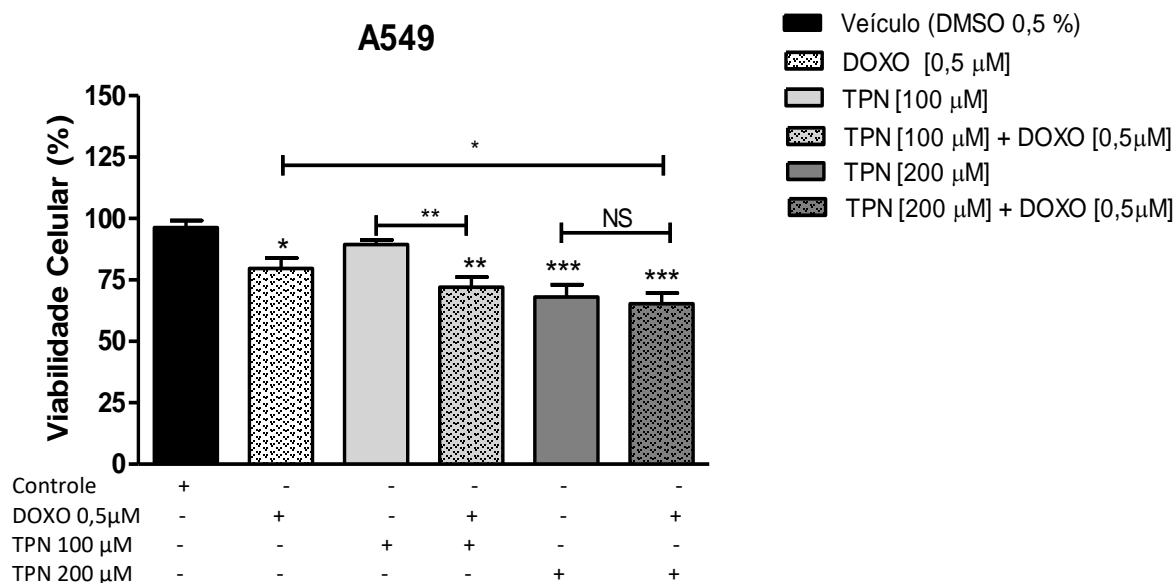


FIGURA10: Efeito da associação de doxorrubicina e α -terpineol em células A549. As células foram tratadas com doxorrubicina (DOXO) e α -terpineol (TPN) por 48 h. A viabilidade foi avaliada pelo método de MTT. Análise ANOVA (Bonferroni), *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; NS: não significativo (n=4).

Visto que o efeito de diversos fármacos utilizados na terapêutica do câncer se dá a longo prazo, objetivou-se avaliar o efeito do terpeno após 6 dias de tratamento repetido. Desta forma, as células foram expostas a dois tratamentos distintos por um período de 144 h: a) tratamento com reposição de TPN, b) tratamento sem reposição de TPN. A FIGURA 11 indica os resultados da primeira avaliação, após o tratamento de 6 dias (144 h) com reposição de TPN a cada 48 h. Foi observada gradativa redução da viabilidade celular com comportamento tempo- e dose-dependente. Nos três tempos avaliados (48 h, 96 h e 144 h), o TPN na concentração de 200 μM evidenciou um comportamento semelhante à DOXO 1 μM - não apresentando diferença estatística em relação a doxo. Após 96 h de tratamento, o TPN na concentração de 100 μM reduziu a viabilidade para $63 \pm 11,4 \%$, enquanto que o TPN na concentração de 200 μM reduziu ainda mais a viabilidade ($18 \pm 4,5 \%$), similar a concentração de 1 μM de DOXO, que apresentou $19 \pm 5,8 \%$ de viabilidade. Entretanto, a associação do TPN de 100 μM com a DOXO 1 μM reduziu a viabilidade das células à $17 \pm 5,2 \%$ e a associação de TPN 200 μM e DOXO 1 μM : $14 \pm 4,6 \%$. Porém, após 144 h de tratamento, as células tratadas com 100 μM de TPN apresentaram uma viabilidade de $32 \pm 8,4 \%$, enquanto que as células tratadas com 200 μM de TPN e 1 μM de DOXO apresentaram viabilidades de $12 \pm 2,2 \%$ e $11 \pm 2,1 \%$, respectivamente. As células tratadas com a associação dos dois compostos, TPN (100 μM) e DOXO (1 μM) apresentaram uma viabilidade reduzida à $11 \pm 2,3 \%$. Assim como as células tratadas com a associação de TPN na concentração de 200 μM e DOXO de 1 μM apresentaram $10 \pm 2,4 \%$ de viabilidade. Por outro lado, a potencialização de efeito da associação de TPN com DOXO observada em 48 h, não se manteve ao final das 96 h e 144 h de tratamento repetido.

Já na segunda avaliação, após o tratamento único com os compostos TPN e DOXO, foi realizada sucessiva reposição apenas de meio de cultivo, sem tratamento, a cada 48 h. Na FIGURA 12 é possível observar que o efeito de redução gradativa da viabilidade celular se manteve. Em 96 h: TPN 100 μM ($79 \pm 9 \%$), TPN 200 μM ($43 \pm 5,2 \%$) semelhante à DOXO 1 μM ($39 \pm 7,2 \%$), enquanto que associados TPN 100 μM + DOXO 1 μM ($36 \pm 6,3 \%$) e TPN 200 μM + DOXO 1 μM ($32 \pm 6,7 \%$). Já em 144 h: TPN 100 μM ($61 \pm 14 \%$), TPN 200 μM ($22 \pm 6 \%$) semelhante à DOXO 1 μM ($20 \pm 1,2 \%$), enquanto que associados TPN 100 μM + DOXO 1 μM ($17 \pm 2 \%$) e TPN 200 μM + DOXO 1 μM ($16 \pm 1,8 \%$).

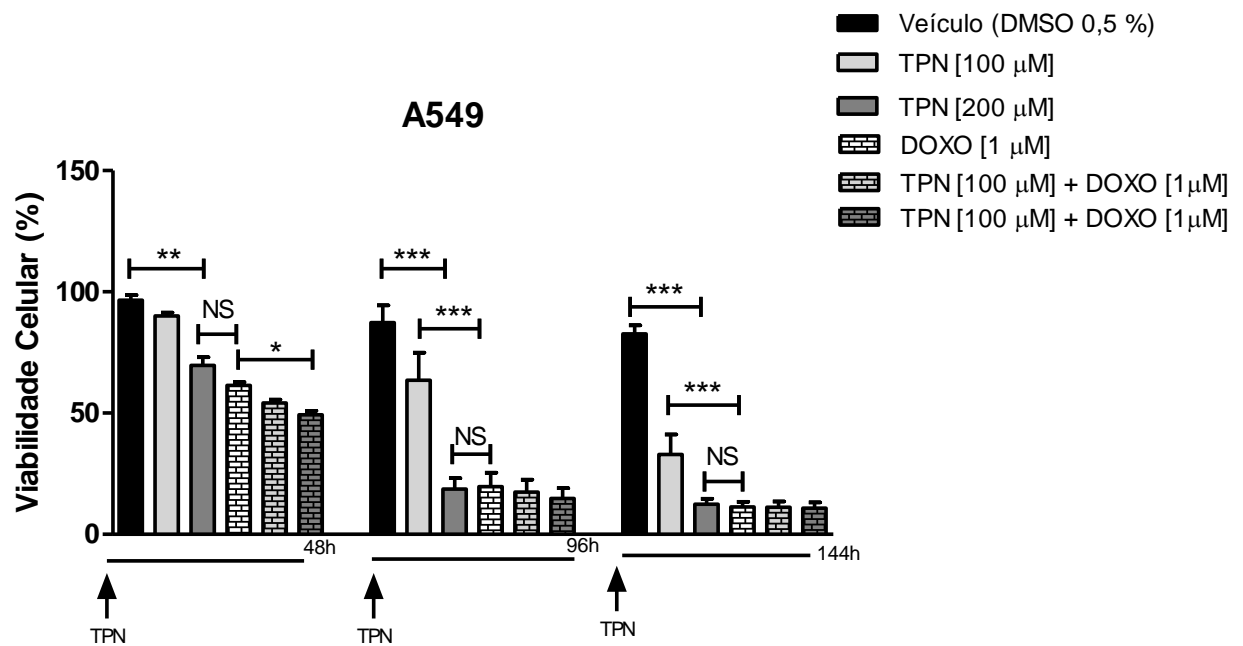


FIGURA 51: Efeito crônico da associação de doxorubicina e α -terpineol em células A549. As células foram tratadas com doxorubicina (DOXO) e α -terpineol (TPN) por 144 h, sendo o tratamento repostado a cada 48 h. Análise ANOVA (Bonferroni), * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 em relação ao veículo; NS: não significativo. (n=4).

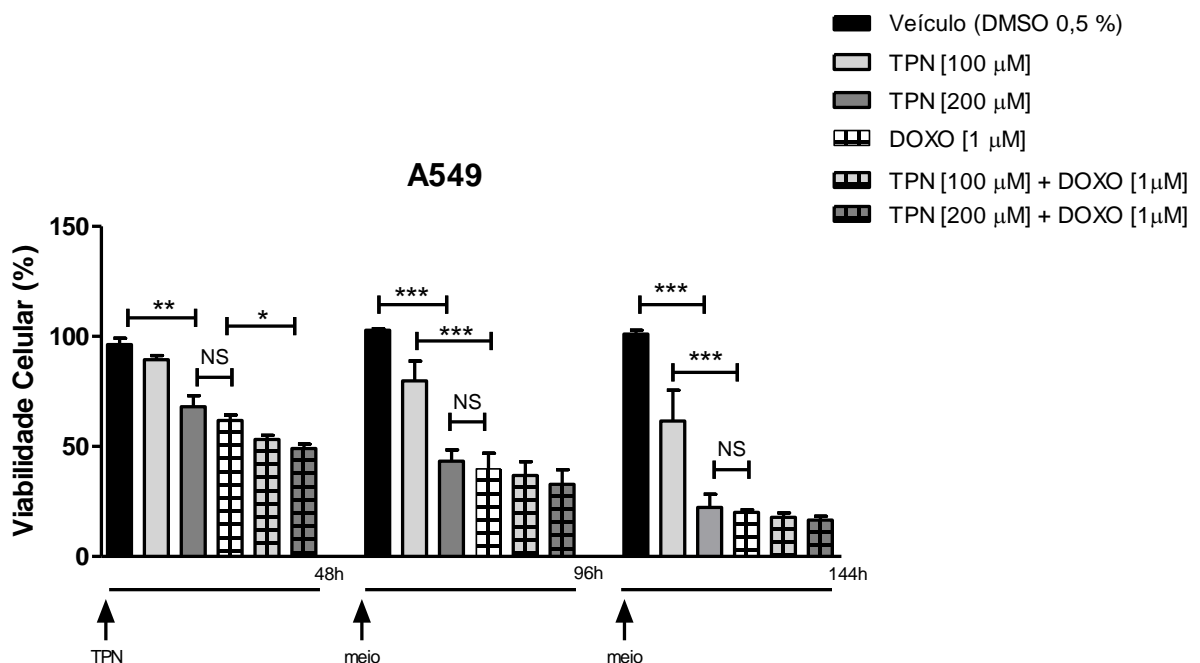


FIGURA 62: Efeito crônico da associação de doxorubicina e α -terpineol em células A549. As células foram tratadas uma única vez com doxorubicina (DOXO) e α -terpineol (TPN) e a cada 48 h o meio de cultivo foi trocado. Análise ANOVA (Bonferroni), p <0,05; NS: não significativo. (n=4).

Através do teste de citotoxicidade por exclusão com azul de tripan, observou-se comportamento semelhante ao apresentado no teste de viabilidade por MTT. O TPN 200 μM reduziu a viabilidade celular similarmente à DOXO 1 μM após 144 h de tratamento, sem apresentar diferença significativa entre eles (FIGURA 13A), assim como, após 48 h de tratamento apenas com o TPN 200 μM , que reduziu à 75 % a viabilidade celular (FIGURA 13B).

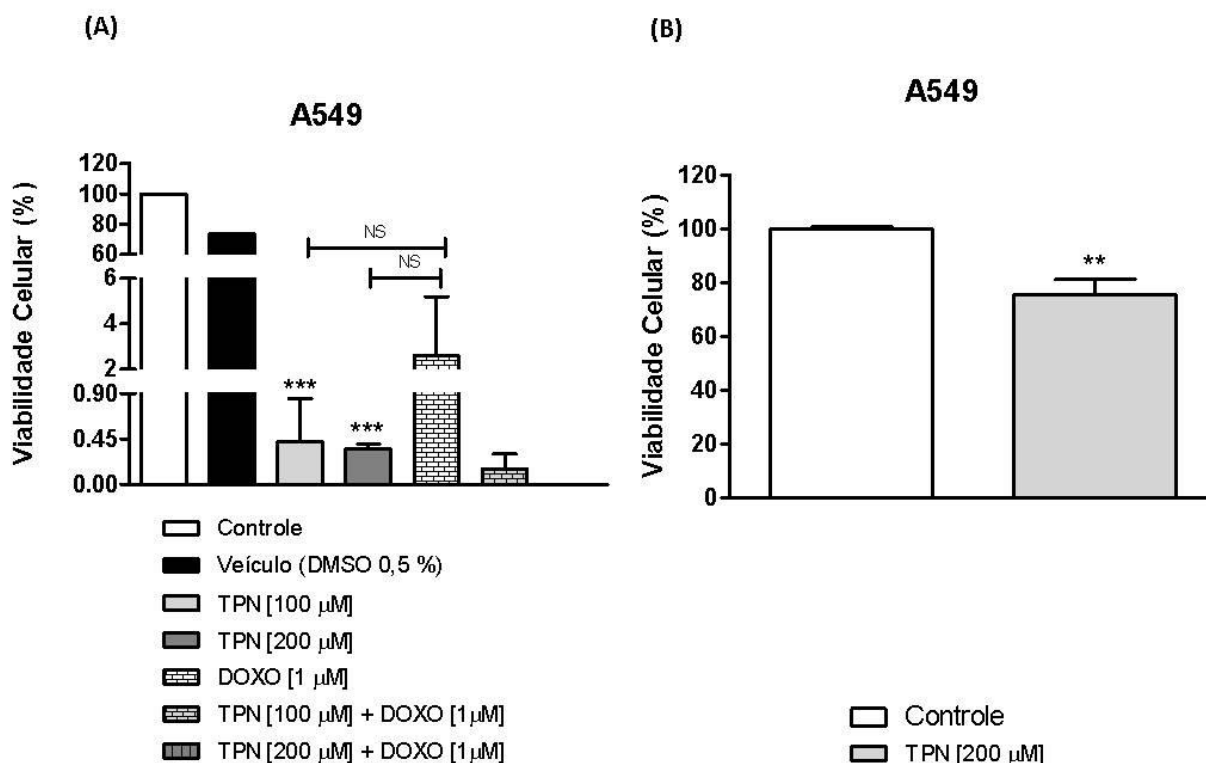


FIGURA 13: Citotoxicidade de α -terpineol em células A549. As células foram tratadas com α -terpineol (TPN) em associação ou não com doxorubicina (DOXO) por (A) 144 h ou (B) 48 h. A citotoxicidade foi avaliada através de contagem por exclusão com azul de tripan. Análise ANOVA (Bonferroni). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; NS: não significativo. (n=4).

4.3 Alterações morfológicas

Após os tratamentos de 48 h e 144 h, as células foram fotografadas para avaliar as alterações morfológicas resultantes da exposição ao quimioterápico e ao terpeno bem como associação de ambos os compostos. Foi possível observar uma redução significativa da população celular após o tratamento de 48 h com o TPN em 200 μM e DOXO em 1 μM , bem como nas associações (FIGURA 14). Já, após 144 h, observou-se redução na população celular quando tratada com 1 μM de DOXO, 200 μM de TPN e suas associações. Após

tratamento por 144 h com DOXO 1 μM foi possível observar alteração morfológica da célula como núcleo picnótico e pseudópodes em forma de crescente (FIGURA 14).

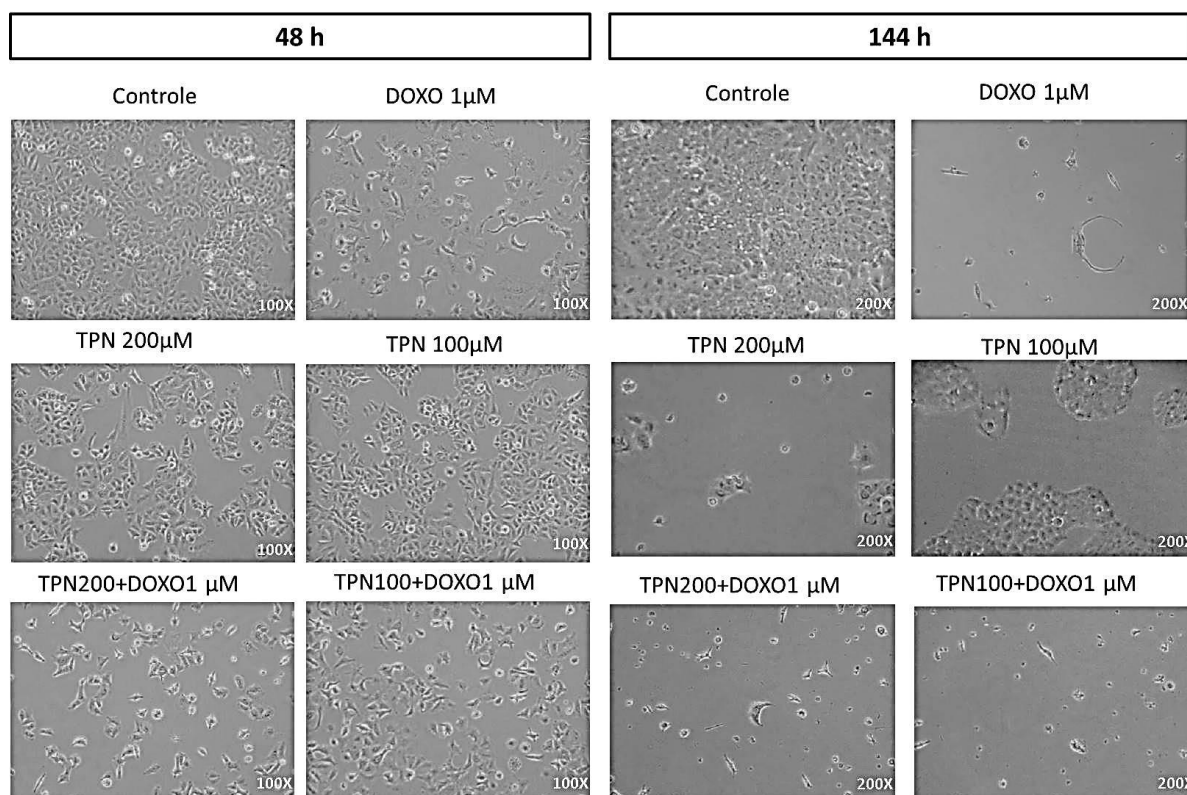


FIGURA 74: Alterações morfológicas após 48 h e 144 h de tratamento com o α -terpineol (TPN), doxorubicina (DOXO) e suas associações. Aumento de 100 x e 200 x.

4.4 Inibição enzimática

Com base nos resultados de viabilidade celular, partiu-se para a análise de mecanismo celular pelo qual os compostos estariam atuando. Inicialmente, foi avaliado o potencial do TPN de inibir a atividade das proteínas p38- α , JAK-3 e JNK-3 *in vitro*. De acordo com a FIGURA 15, o TPN apresentou potencial inibitório de p38- α ($\text{IC}_{50} = 729 \mu\text{M}$). A concentração de 200 μM de TPN teve uma capacidade inibitória de 30 % quando comparada ao inibidor padrão SB203580 ($\text{IC}_{50}=0,061 \mu\text{M}$). Já, para JAK-3, o TPN apresentou um $\text{IC}_{50} = 6,3 \mu\text{M}$, enquanto que o padrão Tofacitinib exibiu um $\text{IC}_{50} = 2,3 \text{ nM}$. Em relação à inibição de JNK-3, não foi possível determinar um IC_{50} para o TPN com base nas concentrações testadas, entretanto, o padrão SP600125 apresentou $\text{IC}_{50} = 0,160 \mu\text{M}$.

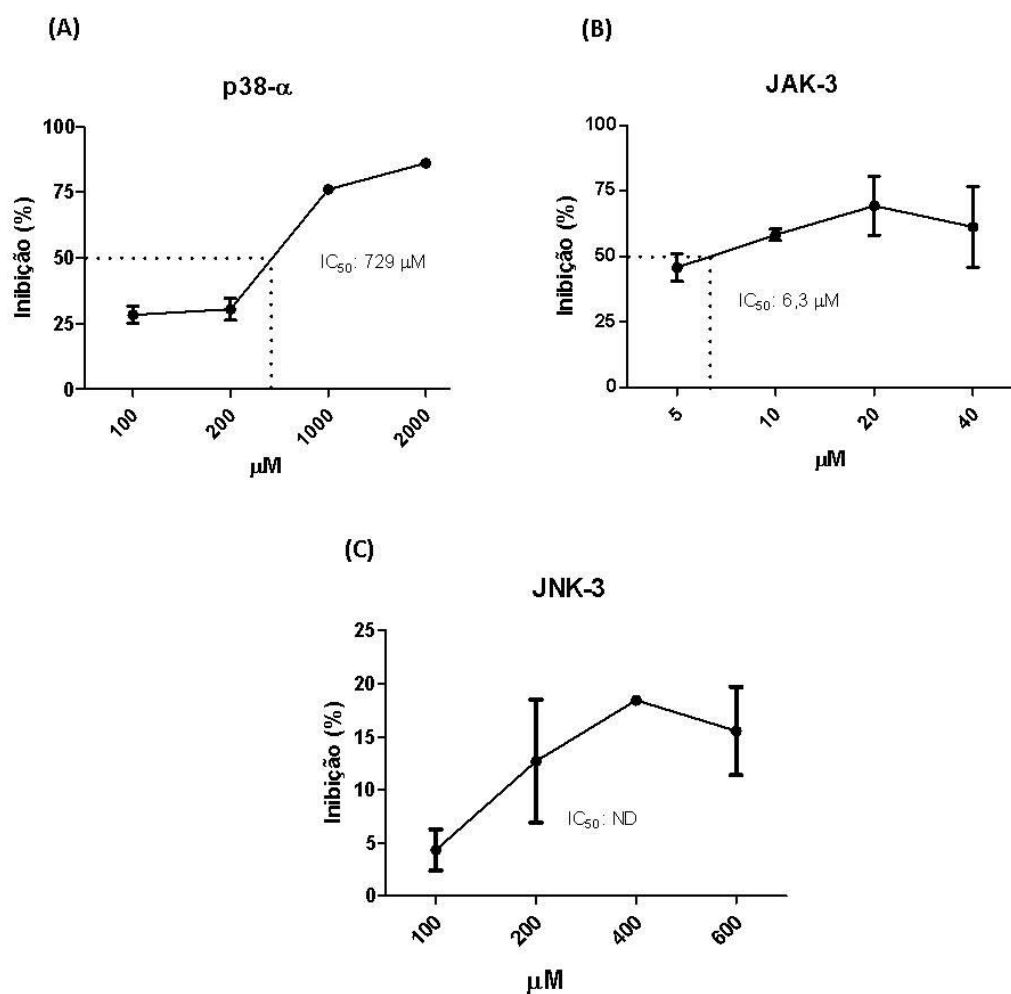


FIGURA 85: Potencial inibitório *in vitro* de α -terpineol sobre a atividade das proteínas p38- α , JAK-3 e JNK-3. (A) Inibição de p38- α ; (B) inibição de JAK-3; (C) inibição de JNK-3 (n=2). ND, não determinado.

4.5 Liberação de TNF- α

Após a análise de inibição enzimática, foi avaliado o efeito do TPN sobre a liberação de TNF- α . Primeiramente, as células foram tratadas por 48 h, 96 h e 144 h, porém, não foi possível observar diferença significativa na liberação dessa citocina entre os tratamentos e períodos de exposição à droga analisados (FIGURA 16).

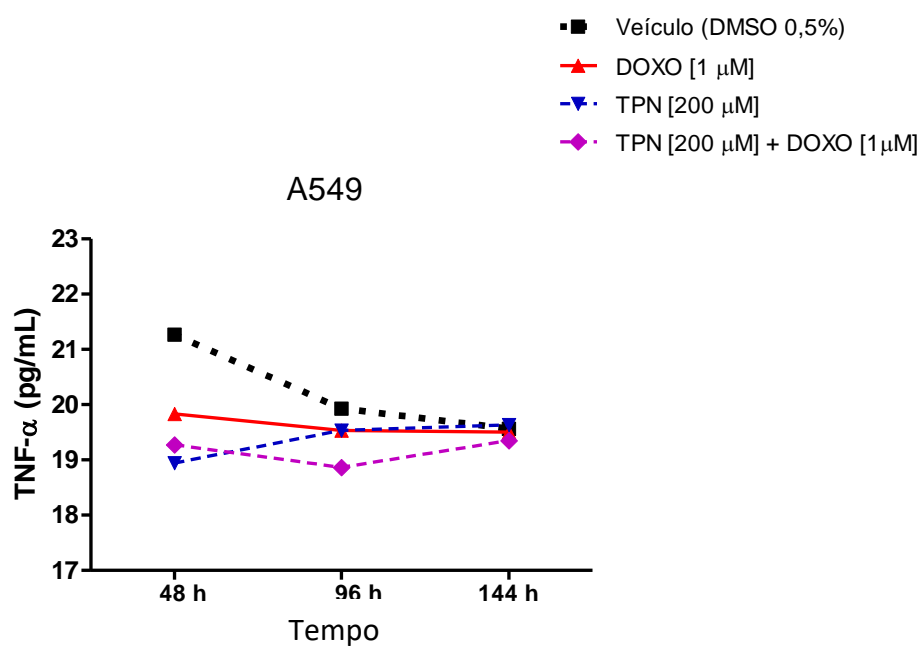


FIGURA 96: Efeito do α -terpineol sobre a liberação de TNF- α em células A549. As células foram tratadas com α -terpineol (TPN), doxorubicina (DOXO) e sua associação em diferentes tempos (n=1).

Posteriormente, analisou-se a capacidade do TPN de inibir a liberação *in vitro* de TNF- α em sangue total humano (ELISA) após estimulação por LPS. Para esse ensaio, concentrações crescentes do TPN (50 μ M à 400 μ M) foram utilizadas a fim de determinar a concentração com efeito. Apenas na concentração de 400 μ M de TPN, observou-se inibição de 13,5 % de TNF- α (FIGURA 17).

α -terpineol	Inibição (%)
400 μ M	13,4913602
200 μ M	-7,9973416
100 μ M	-9,10500665
50 μ M	-11,8741693

Figura 107: Efeito do α -terpineol sobre a liberação de TNF- α em sangue total humano (n=1).

Por último, foi avaliado o efeito do TPN sobre a liberação de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS por 24 h. Como mostrado pela FIGURA 18, não foi observada nenhuma inibição de TNF- α quando comparado às células controle.

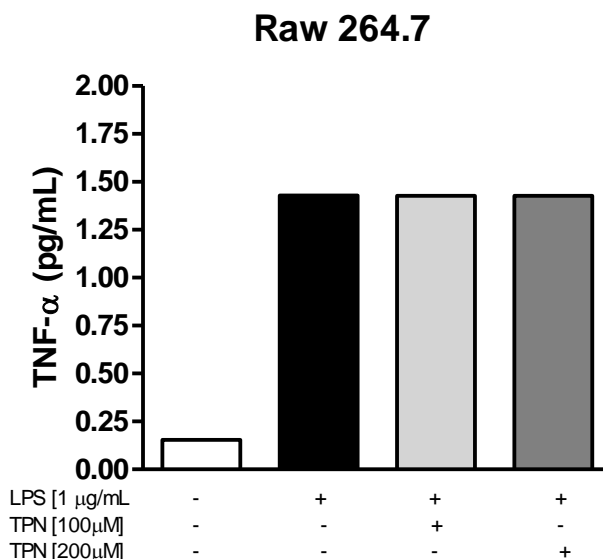


FIGURA 18: Efeito do α -terpineol sobre a liberação de TNF- α em macrófagos Raw 264.7. As células foram tratadas com 100 μ M e 200 μ M de α -terpineol (TPN) e após, estimuladas com LPS por 24 h (n=1).

4.6 Citometria de fluxo

O efeito do TPN sobre a morte das células A549 foi avaliado por citometria de fluxo utilizando os marcadores anexina e 7-AAD. Na FIGURA 19 é possível observar que após 48 h de tratamento, o TPN (200 μ M) induziu em torno de 13 % de células à apoptose e 7,3 % à necrose, mantendo a viabilidade de cerca de 77 % da população celular. Por outro lado, a DOXO (1 μ M) induziu 17 % das células à apoptose e 21,5 % à necrose. Já, quando associados o TPN e DOXO, o número de células necróticas aumentou para 33,5 %, enquanto que as células apoptóticas se mantiveram na faixa de 16,5 %.

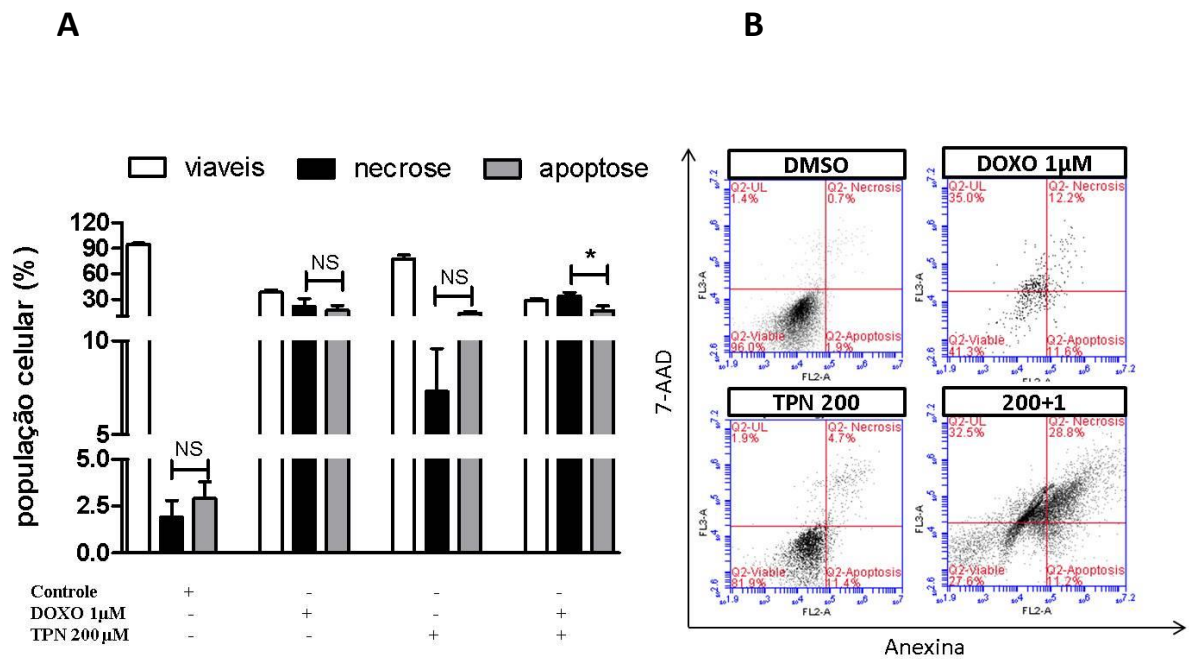


FIGURA 19: Efeito do α -terpineol sobre a morte programada de células A549. (A) As células foram tratadas por 48 h com α -terpineol (TPN), doxorubicina (DOXO) e sua associação. (B) Fluxograma de dispersão de citometria de fluxo de A549 coradas com anexina V-PE e 7-AAD-FITC. O quadrante inferior esquerdo mostra as células viáveis, que são negativas para anexina V e 7-AAD. O quadrante inferior direito representa as células apoptóticas, positivas para anexina V e negativas para 7-AAD. O quadrante superior direito contém as células apoptóticas tardias ou necróticas, que são positivas para anexina V e 7-AAD. Análise ANOVA (Bonferroni). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; NS: não significativo. (n=2).

De acordo com a FIGURA 20, ao analisar a morte celular após 6 dias de tratamento, com o TPN a 200 μ M, ocorre uma redução de aproximadamente 40 % de apoptose para as células remanescentes e 1,4 % de necrose, sendo 57 % viáveis. Porém, deve-se considerar o desvio encontrado entre os experimentos realizados. Já, a DOXO 1 μ M apresentou taxas semelhantes para necrose e apoptose (28 % e 28,2 % respectivamente). Quando associados o TPN e DOXO, a taxa de necrose foi de 52,3 % e apoptose 21,5 %.

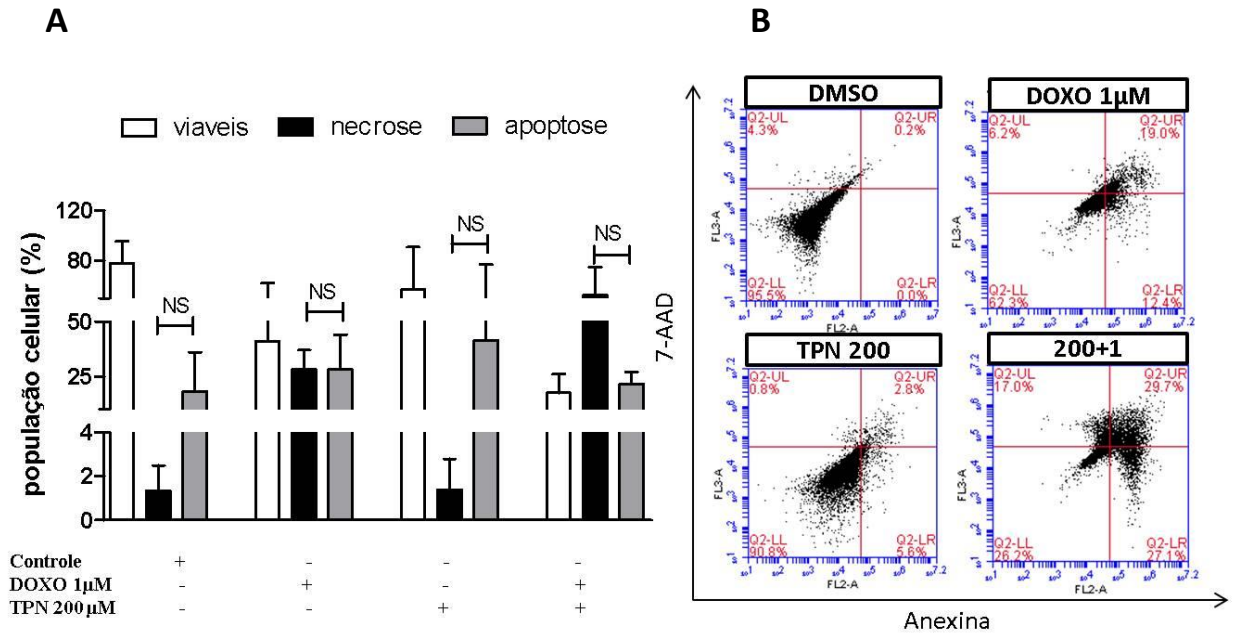


FIGURA 20: Efeito do α -terpineol sobre a morte programada de células A549. (A) As células foram tratadas por 144 h com α -terpineol (TPN), doxorrubicina (DOXO) e sua associação. (B) Fluxograma de dispersão de citometria de fluxo de A549 coradas com anexina V-PE e 7-AAD-FITC. O quadrante inferior esquerdo mostra as células viáveis, que são negativas para anexina V e 7-AAD. O quadrante inferior direito representa as células apoptóticas, positivas para anexina V e negativas para 7-AAD. O quadrante superior direito contém as células apoptóticas tardias ou necróticas, que são positivas para anexina V e 7-AAD. Análise ANOVA (Bonferroni). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; NS: não significativo ($n=2$).

O fenômeno de migração foi analisado por 72 h e 120 h a fim de avaliar o fechamento central da descontinuidade da monocamada após tratamento com o TPN. Após 120 h, observou-se que na concentração de 200 μ M o TPN resulta em redução estatisticamente significativa da migração celular (35 % de fechamento) quando comparado ao controle veículo (58 % de fechamento) (FIGURA 23). Em constraste, observou-se redução do efeito quando do tratamento com metade da concentração do TPN (63 % de fechamento), enquanto que em 72 h observou-se fechamento de 15 % (TPN 200 μ M), 45% (TPN 100 μ M) e 43 % (controle veículo).

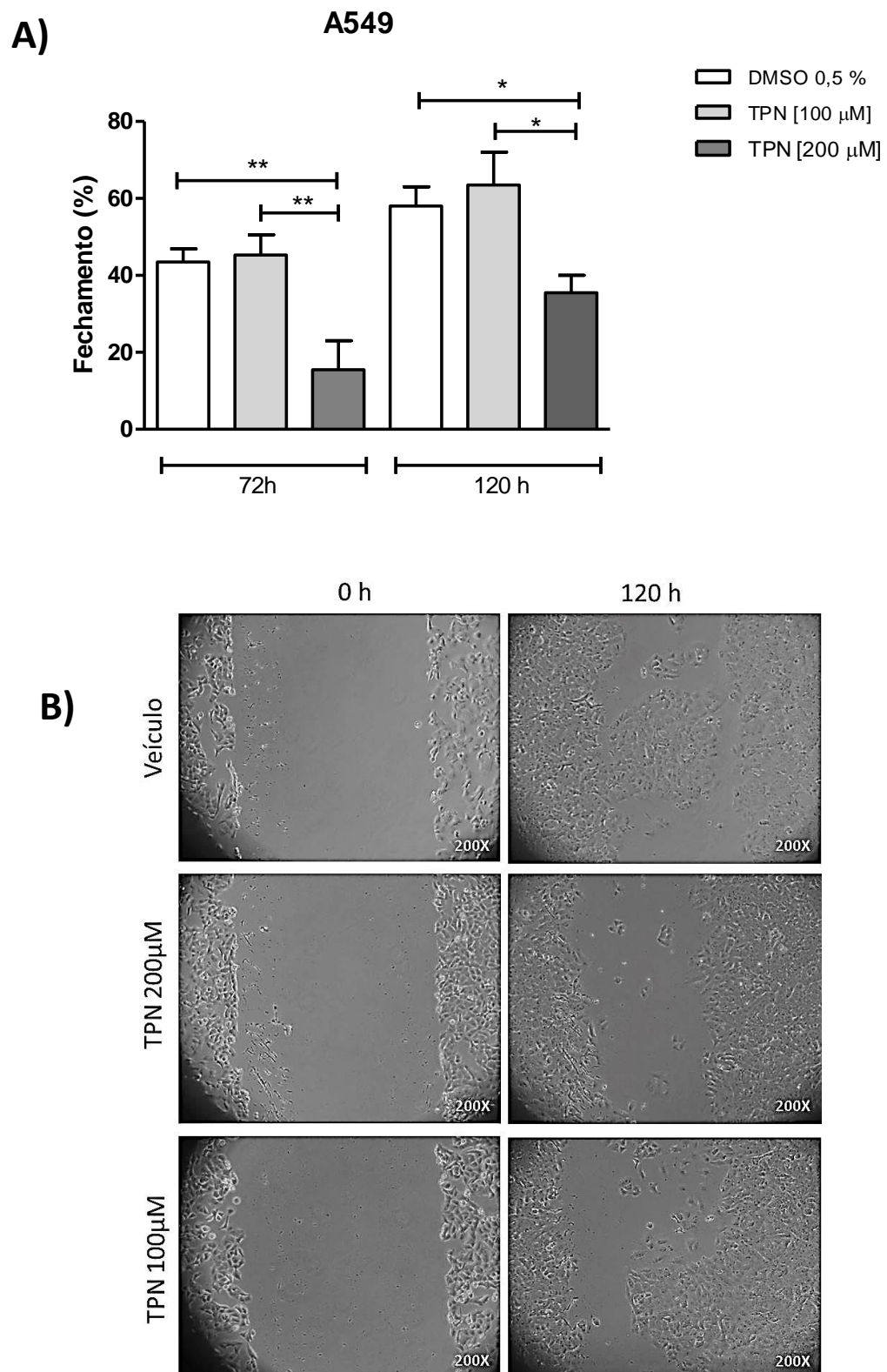


FIGURA 111: Análise da migração celular em A549 após tratamento com TPN. A) Expressão gráfica da migração após 72 h e 120 h. n=2/1. B) Alteração visual da migração celular após 120 h de exposição ao TPN nas concentrações de 100 e 200 µM em comparação ao controle (DMSO 0,5%). Aumento 200 x. n=2.

5. DISCUSSÕES

Os produtos naturais são fonte de estudos na busca por novas biomoléculas para desenvolvimento de fármacos. Os terpenos, componentes dos óleos essenciais, como o α -terpineol, são interessantes fitoconstituintes estudados quanto as suas propriedades biológicas e terapêuticas. Alguns estudos envolvendo o TPN relataram além do seu efeitos antiséptico e anti-inflamatório, o efeito anti-proliferativo em diferentes linhagens celulares, embora seu mecanismo de ação ainda permaneça pouco elucidado.

Hassan (2010) demonstraram o efeito anti-câncer de α -terpineol em linhagem pulmonar NCI-H69 (adenocarcinoma de pequenas células). Os autores evidenciaram que dentre as 10 linhagens tumorais analisadas, a linhagem NCI-H69 foi a mais sensível ao TPN - fato que concorda com o *screening* realizado neste trabalho. O presente trabalho, relata pela primeira vez, o efeito do TPN frente a linhagem de câncer de pulmão A549, sendo que esta também foi a linhagem mais sensível ao TPN dentre as 6 analisadas. A dose e o tempo utilizados por Hassan (780 μ M à 12,5 mM por 72h), foram superiores aos utilizados inicialmente neste estudo (200 μ M, 48h). O método utilizado pelos autores para experimentos de citotoxicidade foi FMCA, o qual se baseia na fluorescência gerada por células com membrana intacta. Neste trabalho utilizou-se método MTT (para viabilidade celular) o qual avalia a atividade mitocondrial das células viáveis e a exclusão por azul de tripan (para citotoxicidade) que avalia incorporação do corante por células com membrana danificada. Mesmo utilizando um método diferente e outra linhagem pulmonar (NCI-H69), observa-se a constância do efeito anti-proliferativo do TPN de maneira dose e tempo-dependente, visto que houve 50 % de redução em 72 h na dose de 260 μ M (HASSAN et al. 2010) e no presente estudo: 30 % de redução em 48 h na dose de 200 μ M.

Ainda, no presente trabalho, a linhagem colorretal (HT-29) teve a viabilidade celular influenciada pelo TPN, da mesma forma como observado por Hassan et al. (2010) em outras duas linhagens colorretais (HCT-116 e HCT-8). Embora Hassan não tenha evidenciado efeito do TPN na linhagem HT-29 pelo método FMCA, observou-se redução significativa (75 %) da viabilidade celular nesta mesma linhagem pelo método MTT. Além disso, o TPN reduziu a viabilidade MCF-7 em 74 % após tratamento com 200 μ M de TPN. Esse efeito pode estar relacionado com inibição de genes como IL-1b, IL1R1, AKT1S1 (regulados por NF- κ B), observado por Hassan nesta mesma linhagem.

Poornima et al. (2014) associaram um composto natural à DOXO com intenção de sensibilizar A549 ao quimioterápico para reverter casos de resistência à droga. No presente estudo, a justificativa da associação foi, além da resistência, a potencialização do efeito, e redução da dose do quimioterápico.

Quando avaliada a viabilidade das células na associação de TPN 200 μ M e DOXO 1 μ M observa-se potencialização do efeito frente a redução da viabilidade em 51 %, em comparação à ambos compostos isoladamente TPN (32 %) e DOXO (38 %). Essa potencialização do efeito, indica potencial aditivo entre os compostos – concordando com os resultados de Poornima et al. (2014) que observou aumento da citotoxicidade para 49 % quando da associação de DOXO 2 μ M com neferine 10 μ M. Os autores sugerem que co-tratamento de neferine com doxo, demonstrou efeito tóxico mínimo em linhagem de cardiomiócito embrionário H9C2, comparado à DOXO 2 μ M sozinha. Tendo em vista a possível seletividade deste composto natural, pode-se sugerir que o TPN também possa desempenhar tal efeito (necessário mais estudos em linhagens não-tumorais). Ainda comparando com dados de Poornima et al. (2014), no presente estudo utilizou-se a metade da dose de DOXO para associação em 48 h obtendo resultados de potencialização de efeito semelhantes (51 % neste estudo e 49 % dos autores).

Em relação a morfologia, após 6 dias de tratamento com a DOXO 1 μ M observou-se alteração em algumas células de A549 (como núcleo picnótico, vacúolos e pseudópodes em forma de crescente). Tal comportamento também é relatado por CRESCENZI; PALUMBO; BRADY (2005), após 10 dias de tratamento com DOXO 0,5 μ M na mesma linhagem - fato esse sugerido pelo autor como resultante da senescência celular. Segundo os autores, baixas doses de doxorubicina induzem senescência prematura em boa parte das células dessa linhagem inviabilizando-as de proliferarem.

Em se tratando do efeito de tratamento repetido até 144 h, observou-se que o efeito de redução gradativa da viabilidade celular se manteve. Posteriormente optou-se por tratamento único seguido de reposição de meio a cada 48 h até o 6º dia. De forma similar, foi demonstrado em uma linhagem de câncer de pulmão, no qual o tratamento inicial e sua reposição de meio por 6 dias, resultou em aumento e potencialização do efeito quando associado etoposídeo com verapamil (MERRY et al., 1998). Ainda, CRESCENZI et al. (2005) relataram que tratamento inicial com roscovitina e reposição de meio por 6 dias, induziu as células à senescência e modificou significativamente sua morfologia. Esses exemplos sugerem que o efeito se dá pelo mecanismo inicial da primeira dose – a qual perdura com o passar do tempo.

Dentre os diversos mecanismos relacionados a indução de senescência, parada no ciclo celular, o TPN destaca-se quanto a inibição da rota de NF κ B e citocinas já observada por HASSAN et al (2010). Desta forma, buscou-se avaliar a atividade do TPN frente a inibição da liberação de TNF- α .

Quanto à liberação de TNF- α , não foi possível observar diferença significativa após 48 h, 96 h e 144 h de tratamento com TPN – provavelmente devido ao terpeno não ter efeito na produção de citocinas na ausência de estímulo (NOGUEIRA et al., 2014). Resultados em linhagem de macrófagos após 24 h de estimulação com LPS evidenciaram a não interferência do TPN na inibição da liberação de TNF- α . Esses dados concordam com Nogueira et al. (2014) que afirmou que a produção dessa citocina pós estimulação por LPS não foi afetada pelo TTO (terpinen-4-ol e α -terpineol) transcorridas 24 h de exposição à mesma concentração de LPS e linhagem celular utilizadas neste trabalho. Somado a isso, os dados de HART et al. (2000) igualmente concordam com o exposto, visto que os autores observaram que o TPN não influe sob as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-8 e PGE2 após 40 h de estímulo com LPS (metade da dose) e em linhagem de monócitos. A fim de avaliar a inibição dessa citocina em microambiente mais complexo, testou-se a habilidade inibitória do TPN em sangue total humano. Todavia, verificou-se apenas 13 % de inibição de TNF- α após tratamento com 400 μ M do TPN seguido de estimulação com LPS. A inibição da liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos estimulados por LPS foi atribuído à capacidade de terpinen-4-ol em interferir na via p38, NF- κ B ou vias de ERK MAPK (NOGUEIRA et al., 2014).

Com base em atividade considerável frente a inibição de JAK3 e AKT1 por terpenos observada por outros autores, investigou-se a atividade de TPN frente a outras enzimas também envolvidas no processo tumoral, como JNK3 e p38- α , em linhagem A549.

O potencial inibitório da p38 α (IC₅₀= 729 μ M) apresentado pelo TPN sugere, em parte, que o possível mecanismo de ação do efeito anti-proliferativo pode se dar devido a essa MAPK estar envolvida na via de parada de ciclo celular e apoptose. Com base em HASSAN et al. (2010), o TPN a 5,8 mM apresenta potencial inibitório de AKT1 (35 %) e JAK3 (48 %), sendo que no presente estudo determinou-se o IC₅₀=6,3 μ M do TPN para inibição de JAK3. Neste trabalho, não foi possível determinar o IC₅₀ para JNK3 na faixa de concentrações de TPN testadas (100-600 μ M).

Os resultados de citometria, indicaram 41 % das células em apoptose após 6 dias de tratamento com 200 μ M em A549. Após 48 h de tratamento, o TPN a 200 μ M apresentou taxa de 13,3 % de apoptose e 7,3 % de necrose, enquanto Hassan et al. (2010), em estudo de ciclo celular, determinou que após 24 h de tratamento TPN 3 mM induziu 4,2 % de apoptose, e com 6 mM TPN 7,4 % de apoptose (após 6 h) e 10,3 % (após 24 h). Dado ao fato que a redução de dose na terapêutica resulta, maioria das vezes, em maior especificidade de efeito (TOYODA et al., 2008), a dose de 200 μ M utilizado neste estudo superou a taxa de apoptose da dose maior utilizado por HASSAN et al. (2010).

Em relação às análises por citometria da associação de tratamento com TPN e DOXO por 48 h, observa-se potencialização da via necrótica; enquanto TPN 200 μ M sozinho induz 7,3 % necrose, a DOXO 1 μ M induz 21,5 %, e, associados aumentam para 33,5 % esta via. Contrariamente, Poornima et al. (2014) evidenciou em A549 e 48 h de tratamento, um aumento de apoptose em 47,4 % quando da associação do composto natural neferine com DOXO 2 μ M em relação a esses compostos sozinhos (6,9% e 18,4%, respectivamente) – efeito oposto ao observado no presente estudo. Sabe-se que a DOXO induz tanto a via da apoptose pela inibição da topoisomerase II como necrose, sendo assim, os produtos naturais neferine e α -terpineol podem estar ativando vias diferentes quando associados a este quimioterápico, preferenciando ativação de uma via ao invés da outra.

A literatura apresenta necrose para DOXO quando há aumento de dose (SONG et al., 2016), todavia ao transcorrer 6 dias percebe-se que mesmo na dose de 1 μ M, predomina a necrose em detrimento da apoptose – fato que pode estar relacionado ao longo período de exposição constante à droga. Os resultados do tratamento com TPN 200 μ M induzindo apoptose tanto em 48 h como em 144 h sugere que o terpeno seja dose e tempo-dependente, dados que concordam com os dois únicos artigos publicados referente aos efeitos apoptóticos do TPN (HASSAN et al., 2010; ITANI et al., 2008).

A capacidade de migração das células cancerosas permite seu deslocamento através dos tecidos. Através desse processo, as células neoplásicas invadem os vasos sanguíneos e se

disseminam na circulação, desenvolvendo metástases e assim, alcançando órgãos distantes (MICHAELIS, 2014). Tendo em vista a importância da supressão da migração celular para retardar a progressão tumoral, avaliou-se o potencial do TPN frente à migração celular *in vitro*.

A redução da migração celular observada após tratamento com TPN na dose de 200 μ M concorda com resultados De Oliveira et al. (2012) que verificou a capacidade inibitória deste mesmo terpeno na migração celular de neutrófilos. Os autores sugerem que esse efeito é resultante da inibição de moléculas envolvidas em processos inflamatórios como os eicosanoides pela supressão de NF- κ B. Tendo em vista que mediadores do metabolismo do ácido aracdônico estão relacionados com a migração celular induzida por carragenina (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999), a capacidade do TPN em inibir produção de nitritos reforça sua capacidade de interferência na migração celular e consequente inibição da progressão tumoral.

Mais análises são necessárias para elucidar o mecanismo de ação pelo qual a associação de TPN e DOXO está ocorrendo, todavia pode-se sugerir que as vias de apoptose sejam predominantemente ativadas quando do tratamento com o TPN sozinho em detrimento de necróticas. Quando da associação, o predomínio de necrose ocorre, possivelmente devido ao direcionamento da DOXO para a via necrótica. A atividade de redução da proliferação celular do TPN sugere que esse composto possua mais de um mecanismo de ação responsável pelos efeitos citotóxicos observados (HASSAN et al., 2010), dentre eles a via de sinalização do NF- κ B - que ainda é foco de estudos.

6. CONCLUSÕES

O câncer continua sendo uma das patologias com maior índice de morbidade, atingindo milhões de pessoas a cada ano no mundo. Com estimativas crescentes, tal doença resulta na diminuição da qualidade e sobrevida dos pacientes cujos tratamentos usuais (de baixa seletividade) resultam em diversos efeitos adversos. Com base no advento do emprego de biomoléculas oriundas de produtos naturais no desenvolvimento de fármacos, compostos como óleos essenciais e plantas destacam-se devido aos seus importantes fitoconstituintes. O α -terpineol, terpeno cujo aplicabilidade já era evidenciada amplamente na indústria como antiséptico, anti-inflamatório, apresenta capacidade anti-proliferativa em células tumorais *in vitro*.

Com base nos dados de viabilidade celular e citotoxicidade, o TPN apresenta satisfatória atividade anti-proliferativa e citotóxica em linhagem de pulmão A549, mama MCF-7 e colorretal HT-29. Quando administrado em combinação com a DOXO, o terpeno potencializa o efeito citotóxico de A549 após 48 h quando comparada com a DOXO sozinha. Ao final de 6 dias de tratamento com o TPN, o efeito de redução da viabilidade celular aumenta gradativamente de modo dose- e tempo-dependente, demonstrando similaridade com o quimioterápico DOXO. Sendo assim, apresenta semelhança de efeito com a DOXO, demonstrando eficácia e potencial emprego nesta linhagem. Além disto, o potencial inibitório significativo frente a proteínas quinases envolvidas na tumorigênese como a JAK3 e p38 α . Sugere o TPN como molécula candidata a estudos e prospecção futura de alternativas de tratamento para câncer de pulmão. Tendo em vista os efeitos sob migração celular, pode-se ainda sugerir que o TPN tenha algum efeito sob a redução de metástase tumoral e invasão celular destas células.

Em conclusão, o TPN apresenta potencial como agente anticancerígeno dado sua atividade frente às linhagens analisadas. Os dados em conjunto, permitem inferir que a eficiente capacidade de redução da viabilidade celular do TPN bem como sua atividade à longo prazo em A549, caracteriza-o como biomolécula potencial no desenvolvimento de novos fármacos ou mesmo seu uso, como coadjuvante no tratamento de câncer de pulmão humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; JOHNSON A.; LEWIS J., M; RAFF M., ROBERTS K., WALTER P.
Biologia Molecular da Célula, 5a ed. Porto Alegre/RS: Editora Artmed. 2010.

ALLEN, M D.; L. J. JONES. "The role of inflammation in progression of breast cancer: Friend or foe? (Review)." **International Journal of Oncology**, v. 47p. 797-805. 2015.

ALVES E.A., GUIMARÃES A.C.R. Cultivo Celular. Cap. 5 p.215-253. In: Fundação Oswaldo Cruz. **Manual da qualidade**, Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **The Global Economic Cost of Cancer**, Livestrong. No. 005444. 2010. Disponível em:
<<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@internationalaffairs/documents/document/acspc-026203.pdf>> acesso em: 02/07/2016.

ANAND, P., A. B. KUNNUMAKKARA, C. SUNDARAM, K. B. HARIKUMAR, S. T. THARAKAN, O. S. LAI, B. SUNG; B. B. AGGARWAL "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes." **Pharmaceutical Research**, v. 25 p.2097-2116. 2008.

ANDREA OECKINGHAUS, MATTHEW S HAYDEN, SANKAR GHOSH. CROSSTALK in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, v. 12.n.8. p 695- 708. 2011.

BADGER AM, COOK MN, LARK MW. SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. **Journal of Immunology**, v.161 p.467-73. 1998.

BALKWILL, F. and A. MANTOVANI "Inflammation and cancer: back to Virchow?" **Lancet** v. 357 p. 539-545. 2001.

BASMADJIAN C.; ZHAO Q.; BENTOUHAMI B.; DJEHAL A.; NEBIGIL C.; JOHNSON R.; SEROVA M., GRAMONT A., FAIVRE S.; RAYMOND E.; DÉSAUBRY L.G. Cancerwars: natural products strike back. **Frontiers in Chemistry Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 2, p 1-18, 2014.

BAUER, S.,GEHRINGER M.,LAUFER S. A direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative evaluation of Janus Kinase 3 (JAK3) inhibitors. **Anal. Meth.**, 2014

BECKERMAN, R., PRIVES, C. Transcriptional regulation by p53. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2 p. 1-18. 2010.

BICAS, J. L., I. A. NERI-NUMA, A. L. RUIZ, J. E. DE CARVALHO and G. M. PASTORE. "Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors." **Food and Chemical Toxicology**, v. 4 p.1610-1615. 2011.

BOX, V. G. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nogalamycin. **J Mol Graph Model**, v. 26, n. 1, p. 14-9, Jul 2007.

BOYCE, M., A. DEGTEREV and J. YUAN. "Caspases: an ancient cellular sword of Damocles." **Cell Death & Differentiation**, v.11 p. 29-37. 2004

BOGOYEVITCH M.A, KOBE B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. **Microbiol Mol Biol Rev** v. 70: p. 1061–1095. 2006.

BUBICI C.; PAPA S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**. v.171 n. 1 p. 24-37, 2014.

BRAVO-CORDERO J.J, HODGSON J. J. L e CONDEELIS J. Directed Cell Invasion and Migration During Metastasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.24 p. 277–283. 2012.

CALLAGY, G. M., P. D. PHAROAH, S. E. PINDER, F. D. HSU, T. O. NIELSEN, J. RAGAZ, I. O. ELLIS, D. HUNTSMAN and C. CALDAS. "Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index." **Clinical Cancer Research**, v.12 p. 2468-2475.2006.

CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 25, p. 3267-85, 2009.

CASTEDO M, PERFETTINI JL, ROUMIER T, ANDREAU K, MEDEMA R, KROEMER G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v.23 p.2825-837. 2004.

CRESCENZI, E.; PALUMBO, G.; BRADY, H. J. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: implications for combination chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 22, p. 8158-71, 2005.

CATZ S. D. and J. L. JOHNSON. "BCL-2 in prostate cancer: a minireview." **Apoptosis** v.8 p 29-37.2003.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**, 2^a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.

CHÁVEZ, J.D.; SÁNCHEZ M.F.; OCAMPO E.A.; PÉREZ A.F.; RODRIGUEZ Y.P.; GÓMEZ G.D.; MARCHAT L.A.; MERA L.F.; HERNANDEZ G.M.; GARGLIO P.; CAMARILLO C.L. Proteomic Profiling Reveals That Resveratrol Inhibits HSP27 Expression and Sensitizes Breast Cancer Cells to Doxorubicin Therapy. **PLOS ONE**. v. 8, 2013.

CHEMIN, B.F. **Manual da Univates para trabalhos acadêmicos: planejamento, elaboração e apresentação**. 3. ed. Lajeado: Univates, 2015. E-book. Disponível em: <<http://>>
CHEN, H.; YANG, X.; FENG, Z. Prognostic value of Caspase-3 expression in cancers of digestive tract: a meta-analysis and systematic review. **International Journal Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 7, p. 10225–10234, 2015.

CHEN, Z. et al. Anti-tumor effects of bakuchiol, an analogue of resveratrol, on human lung adenocarcinoma A549 cell line. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 170-9, 2010.

CHI, S. Structural insights into the transcription-independent apoptotic pathway of p53. **BMB Reports**, v. 47, n. 3, p. 167-172, 2014.

CHIN, Y.W., YOON, K.D., KIM, J. Cytotoxic anticancer candidates from terrestrial plants. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.9 p. 913–942. 2009.

COLEGATE, S.M. AND MOLYNEUX, R.J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. 2nd Edition, **CRC Press Boca Raton**, v.13 p. 605. 2008.

COMPAGNONE, R.S., CHAVEZ, K., MATEU, E., ORSINI, O., ARVELO, F., SUÁREZ, A.I. Composition and Cytotoxic Activity of Essential Oils of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Methods**, v. 2 p. 101-108. 2010.

CORDELL, G.A. Natural Products in Drug Discovery. Creating a New Vision. **Phytochemistry Reviews**, v.1 p.261-273. 2002.

COURTOIS, G. GILMORE, T.D. Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**. V.25, p.6831–6843. 2006.

CRESCENZI, E.; PALUMBO, G.; BRADY, H. J. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: implications for combination chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 22, p. 8158-71, 2005.

DAGNE E, BISLAT D, ALEMAYEHU M, WORKU T. Essential oils of twelve Eucalyptus species from Ethiopia. **Journal of Essential Oil Research**, v.12 p.467–470. 2000.

DAIANE GIL FRANCO. Fator de transcrição nuclear kappa b no sistema Nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia USP**, v. 4. P. 35-39. 2010

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. **Cell**, v.116 p.205-19. 2004.

DANIEL PT, WIDER T, STURM I, SCHULZE-OSTHOFF K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v.15 p.1022-1032. 2001.

DE OLIVEIRA J.C., BRASSESCO M.S., PEZUK J.A., MORALES A.G., VALERA E.T., MONTALDI A.P., SAKAMOTO-HOJO E.T., SCRIDELI C.A., TONE L.G. In vitro PLK1 inhibition by BI 2536 decreases proliferation and induces cell-cycle arrest in melanoma cells. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11 p. 587-92. 2012.

DE OLIVEIRA, M. G. et al. alpha-terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 111, n. 2, p. 120-5, 2012.

DE SOUSA DP, QUINTANS-JÚNIOR LJ, ALMEIDA RN. Evolution of the anticonvulsant activity of α -terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v.45 p. 69–70. 2007.

DESAGHER S, MARTINOU JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.10 p.369-76. 2000.

DI SOTTO A.; DURAZZI F.; SARPIETRO M.G.; MAZZANTI G. Antimutagenic and antioxidant activities of some bioflavours from wine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 141–146, 2013.

DIDONATO, J.A., MERCURIO, F., AND KARIN, M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. **Immunological Reviews**, v.246 p.379–400. 2012.

DIMRI GP. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v.7 p.505-12. 2005
DUGASANI S., PICHIKA M.R., NADARAJAH V.D., BALIJEPALLI M.K, TANDRA S., KORLAKUNTA J.N., Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol, **Journal Ethnopharmacology**, v.127 p. 515–520. 2010.

EID, S. Y.; EL-READIN, M. Z.; FATANI, S. H.; ELDIN, E. E. M. N.; WINK, M. Natural Products Modulate the Multifactorial Multidrug Resistance of Cancer. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 6, p. 146-176, 2015.

EKBOM A, HELMICK C, ZACK M, ADAMI H-O. Ulcerative colitis and colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.323 p.1228–33. 1990.

ENGELS, E. A. et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. **Int J Cancer**, v. 123, n. 1, p. 187-94, Jul 01 2008.

FOLTZ IN, LEE JC, YOUNG PR, SCHRADER JW. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen- activated protein kinase pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272 p.3296-3301. 1997.

FULDA S., Tumor resistance to apoptosis. **The International Journal of Cancer**, v.124 p.511-515. 2009.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Manutenção de Linhagens de Células Animais. In: **Manual da Qualidade**, Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

GALLUZZI L, KEPP O, KROEMER G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13 p.780–788. 2012.

GADGEEL, S. M.; RAMALINGAM, S. S.; KALEMKERIAN, G. P. Treatment of lung cancer. **Radiol Clin North Am**, v. 50, n. 5, p. 961-74, 2012.

GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer, **WHO**, disponível em <<http://globocan.iarc.fr>> acesso em: 03/06/2016.

GOETTERT M., LUIK S., LAUFER S. A direct ELISA assay for quantitative determination of the inhibitory potency of small molecules inhibitors for JNK3. **J Pharm Biomed Anal.**, 2011

GOLDAR, S.; KHANIANI, M. S.; DERAKHSHAN, S. M. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v 16, p. 2129 – 2144, 2015.

GREENBERG R.N, REILLY P.M, LUPPEN K.L, PIERCY S. Chronic prostatitis: comments on infectious etiologies and antimicrobial treatment. **Prostate**, v. 6 p.445-8. 1985.

GRIVENNIKOV ET AL, 2010 S.I. GRIVENNIKOV, F.R. GRETEN, M. KARIN Immunity, inflammation, and cancer **Cell**, v.140 p. 883–899, 2010.

GRIVICICH I, REGNER A, ROCHA A..B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53 p. 335-343. 2007.

GULUMIAN M. The role of oxidative stress in diseases caused by mineral dusts and fibres: current status and future of prophylaxis and treatment. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.196 p.69–77. 1999.

GUPTA S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International Journal of Oncology**, v.22 p.15-20. 2003.

HAO N.B, LU M.H, FAN Y.H, CAO Y.L, ZHANG Z.R, YANG S.M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene**, v. 24, p. 2899-2908, 2005.

HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflamm Res**, v. 49, n. 11, p. 619-26, 2000.

HASSAN, S. B. et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. **Anticancer Res**, v. 30, n. 6, p. 1911-9, 2010.

HOFFMAN, P. C.; MAUER, A. M.; VOKES, E. E. Lung cancer. **Lancet**, v. 355, n. 9202, p. 479-85, 2000.

HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. Signaling to NF-κB. **Genes & Development**, v.18, 2195–2224 2004.

HOENERHOFF, M. J. "Inflammation and cancer: Partners in crime." **The Veterinary Journal** v.206 p. 1-2. 2015.

HOLLENBACH E, NEUMANN M, VIETH M. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. **FASEB Journal**, v.13 p.1550-2. 2004.

HU, Q., WU, D., CHEN, W. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 15142-15147, 2013.

HU, W., FENG, Z. AND LEVINE, A.J. The regulation of multiple p53 stress responses is mediated through MDM2. **Genes Cancer**, v.3 p.199–208. 2012.

HUANG S, JIANG Y, LI Z. Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6 β . **Immunity**, v.6 p.739-49. 1997.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. 3ª ed. rev. ampl. Rio de Janeiro: Inca; 2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: <<https://www.iarc.fr/>> acesso em: 10/06/2016.

ITANI, W. S. et al. Anti colon cancer components from Lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 11, p. 1765-73, 2008.

JAGER, R. and R. M. ZWACKA. "The enigmatic roles of caspases in tumor development." **Cancers (Basel)**, v.2 p.1952-1979. 2010.

JIANG, P., DU, W., HEESE, K. AND WU, M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v.26 p. 9071-9082. 2006.

JOHNSON GV, BAILEY CD. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. **Experimental Neurology** v.183 p.263-8. 2003.

JONES A.S., HUANG. R.Y., CHEN L., CHEN Z.S., FU L., HUANG R. Cytokines in Cancer Drug Resistance: Cues to New Therapeutic Strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, p.155-265. 2016.

KARIN Michael. NF- κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. **Cold Spring Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1 p. 1-14 2009.

KATRIEN VERMEULEN, DIRK R. VAN BOCKSTAELE E ZWI N. BERNEMAN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v.36, p.131–149. 2003.

KAUR GURPREET, VERMA NEELAM. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency **Biotechnology Reports**, v.6. p. 64–78. 2015.

KINGHORN, A.D., BALANDRIN, M.F., American Chemical Society, Division of Agricultural and Food Chemistry. Human Medicinal Agents from Plants. **American Chemical Society**, Washington DC, v.12 p.356. 1993.

KOUL H.K.,PAUL M., KOUL S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. **Genes & Cancer** v. 4 p. 342–359. 2013.

KUMAR S., BOEHM J., LEE J.C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v.2 p.717-26. 2003
LAMPONTI, I., A. M. SAAB and R. GAMBARI "Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division." **International Journal of Oncology**, v.29 p. 989-995. 2006.

LARRUBIA J.R., LOKHANDE M.U., GARCÍA-GARZÓN S., MIQUEL J., SUBIRÁ D. SANZ-DE-VILLALOBOS E.. Role of T cell death in maintaining immune tolerance during persistent viral hepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.19 p. 1877-1889. 2013.

LEE JC, LAYDON JT, MCDONNELL PC. Identification and characterization of a novel protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, v. 372 p.739-46. 1994.

LEU, J. I., DUMONT, P., HAFEY, M., MURPHY, M. E. GEORGE, D. L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. **Nature Cell Biology**, v.6. p.443-450.2004

LI LI, CHAOFENG SHI, ZHONGQIONG YIN, RENYONG JIA, LIANCI PENG, SHUAI KANG, ZHENGWEN LI. Antibacterial activity of -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45 p. 1409-1413. 2014.
MACHADO, A. E. D.; Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.

LIU S.H; LU T.H; SU C.C; LAY I.S; LIN H.Y; FANG K.M; HO T.J; CHEN K.L; SU Y.C; CHIANG W.C; CHEN Y.W. Lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) and its active constituents prevent inflammatory responses in macrophages via JNK/NF- κ B signaling pathway. **Am J Chin Med**.v.42 n.4, p.869-89. 2014

LOWENBRAUN, S. et al. The superiority of combination chemotherapy over single agent chemotherapy in small cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 44, n. 2, p. 406-13, 1979.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75,1951.

MALEK, R., BOROWICZ, K.K., JARGIELO, M. E CZUCZWAR, S.J. Role of nuclear factor κ B in the central nervous system. **Pharmacological Reports**. v.59, p.25-33. 2007.
MANGAL, M., SAGAR, P., SINGH, H., RAGHAVA, G.P.S., AGARWAL, S.M. NPACT: naturally occurring plant-based anti-cancer compound-activity-target database. **Nucleic Acids Research**, v.41, p.1124–1129. 2013.

MEEK, D. W. "Regulation of the p53 response and its relationship to cancer." **Biochemical Journal**, v.469 p. 325-346. 2015.

MIHARA, M., ERSTER, S., ZAIKA, A., PETRENKO, O., CHITTENDEN, T., PANCOSKA, P. MOLL, U. M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Molecular Cell**, v.11 p.577-590. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **ABC do câncer – Abordagens básicas para o controle do câncer**, Rio de Janeiro. 2014.

MIYAZAWA, M. and M. OHSAWA . "Biotransformation of alpha-terpineol by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). " **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50 p. 4916-4918.2002

MURAD, A.M.; KATZ, A.; **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**, Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41. 1996.

MARTINON, F. et al. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 3, p. 213-29, 2007.

MICHAELIS, U. R. Mechanisms of endothelial cell migration. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 21, p. 4131-48, 2014.

NARDIN A. ABASTADO J. P. "Macrophages and cancer," **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 9, p. 3494–3505, 2008.

NEUBERGER, J. S.; FIELD, R. W. Occupation and lung cancer in nonsmokers. **Rev Environ Health**, v. 18, n. 4, p. 251-67, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79 p. 629–661. 2016.

NICHOLSON DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v.407 p.810-16. 2000.

NOGUEIRA, M. N. et al. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1beta, IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflamm Res**, v. 63, n. 9, p. 769-78, 2014.

OECKINGHAUS A, GHOSH S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.1 2009.

OKADA H, MAK TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4 p.592–603. 2004.

OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, A. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 351, p 41–58, 2011.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J.; **Quimica Nova**, v.25 p.976. 2002.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível em:
< <http://www.who.int/gho/publications/en/>> acesso em: 14/05/2016.

PAWEL, D. J.; PUSKIN, J. S. The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon. **Health Phys**, v. 87, n. 1, p. 68-74, 2004.

PARKIN DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 (review). **International Journal of Cancer**, v.118 p. 3030- 3044. 2006.

PITAROKILI, D.; COULADIS, M.; PANAYOTAROU, N. P.; TZAKOU, O.; J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6688. 2002.

POORNIMA, P. et al. Doxorubicin induced apoptosis was potentiated by neferine in human lung adenocarcinoma, A549 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 68, p. 87-98, 2014.

QIAN B.Z., POLLARD J.W., Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v.141 p.39-51. 2010.

QUAIL D.F., JOYCE J.A., Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v.19 p.1423–1437. 2013.

QUINTANS-JUNIOR, L. J., M. G. OLIVEIRA, M. F. SANTANA, M. T. SANTANA, A. G. GUIMARAES, J. S. SIQUEIRA, D. P. DE SOUSA and R. N. ALMEIDA "alpha-Terpineol reduces nociceptive behavior in mice." **Pharmaceutical Biology**, v. 49 p. 583-586. 2011.

RAKOFF-NAHOUM, S.. "Why cancer and inflammation?" **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.79 p.123-130. 2006.

RICART, A. D. "Antibody-drug conjugates of calicheamicin derivative: gemtuzumab ozogamicin and inotuzumab ozogamicin." **Clinical Cancer Research**, v.17 p. 6417-6427. 2011.

RICCI MS, ZONG WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v.11 p.342-57. 2006.

RÍOS J.L; ANDÚJAR I; ESCANDELL J.M; GINER R.M; RECIO M.C. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. **Curr Pharm Des**.v.18, n.12, p.1663-76. 2012

RYU N.H.; PARK K., KIM S., YUN H., NAM D., LEE S., JANG H., AHN K.S. KIM S., SHIM S., CHOI S.. MOSADDIK A., CHO S. AHN k.s. A Hexane Fraction of Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) Induces Anticancer Activity by Suppressing AKT/Mammalian Target of Rapamycin/Ribosomal p70 S6 Kinase in Human Prostate Cancer Cells. **Journal of Medicinal Food**, v.15 p. 231–241. 2012.

RIDGE, C. A.; MCERLEAN, A. M.; GINSBERG, M. S. Epidemiology of lung cancer. **Semin Intervent Radiol**, v. 30, n. 2, p. 93-8, 2013.

SABUNCUOGLU, S. Antiapoptotic effect of aminoguanidine on doxorubicin-induced apoptosis. **Mol Cell Biochem**, v. 394, n. 1-2, p. 129-35, 2014.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 949-56, 1999.

SAEED, M. E.; ABDELGADIR, H.; SUGIMOTO, Y.; KHALID, H. E.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multidrug- resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 644-58, 2015.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 949-56, 1999.

SCARFO, L. and P. GHIA "Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies." **Immunology Letters**, v.155 p. 36-39. 2013.

SELIG, R., GOETTERT M., LAUFER. S. A Frozen Analogue Approach to Aminopyridinylimidazoles Leading to Novel and Promising p38 MAP Kinase Inhibitors. **J Med Chem.**, 2012

SHALINI, S., L. DORSTYN, S. DAWAR and S. KUMAR "Old, new and emerging functions of caspases." **Cell Death & Differentiation**, v.22 p. 526-539. 2015.

SHUH M, BOHORQUEZ H, LOSS GE JR, COHEN AJ. Tumor necrosis factor-alpha: life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury. **Ochsner Journal**, v.13 p.119-30. 2013.

SINGER, B. C.; DESTAILLATS, H.; HODGSON, A. T; NAZAROFF, W. W.; **Indoor Air**, v. 16, p. 179, 2006.

SMITH J.S., LINDSAY L., HOOTS B. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121 p. 621-632. 2007

SOUZA, R., M. CARDOSO, C. MENEZES, J. SILVA, D. DE SOUSA and J. BATISTA "Gastroprotective activity of alpha-terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats." **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences** v.19 p. 277-281.2011.

STARK, T., L. LIVAS and N. KYPRIANOU "Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting." **The Translational Andrology and Urology**, v.4 p.455-463.2015.
STAUDT, L.M. Oncogenic activation of NF-kappaB. Cold Spring Harb. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 2 p.1-30. 2010.

TACAR, Oktay; SASS, Crispin R. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? **Journal of J Pharm Pharmacol.** n.65 v.11 p.1577-89. 2013.

TEICHER, B. A. and R. V. CHARI "Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential." **Clinical Cancer Research**, v.17 p. 6389-6397.2011.

TOMITA, Y., MARCHENKO, N., ERSTER, S., NEMAJEROVA, A., DEHNER, A., KLEIN, C., PAN, H., KESSLER, H., PANCOSKA, P. AND MOLL, U. M. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. **Journal of Biological Chemistry**, v.281 p.8600-8606. 2006.

TOYODA, Y. et al. Sensitivity and specificity of lung cancer screening using chest low-dose computed tomography. **Br J Cancer**, v. 98, n. 10, p. 1602-7, 2008.

VANDEN BERGHE, T. et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117-29, 2013.

VIDEČNIK ZORMAN J, MATIČIČ M, JEVERICA S, SMRKOLJ T. Diagnosis and treatment of bacterial prostatitis. **Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v.24 p.25-9. 2015.

WANG W, CHEN JX, LIAO R. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates

oncogenic ras-induced premature senescence. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.22 p.3389- 403. 2002.

YOUNG-CHEOL, Y.; HAN-YOUNG, C; WON-SIL, C.; CLARK, J. M.; YOUNG-JOON, A.; J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.2507. 2004.

YUAN S, AKEY CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, v.21 p.501–515. 2013.

ZARUBIN, T. and J. HAN .Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, v.15 p.11-18.2005.

ZHENG, D. et al. MicroRNA-299-3p promotes the sensibility of lung cancer to doxorubicin through directly targeting ABCE1. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 9, p. 10072-81, 2015.

ZHAN, Y., Y. CHEN, R. LIU, H. ZHANG and Y. ZHANG "Potentiation of paclitaxel activity by curcumin in human breast cancer cell by modulating apoptosis and inhibiting EGFR signaling." **Archives of Pharmacal Research**, v.37 p.1086-1095. 2014.

ZIEGLER U, GROSCURTH P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v.19 p.124-28. 2004.